

# Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft.<sup>1)</sup>

Von

**Emil Fischer und Emil Abderhalden.**

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)  
(Der Redaktion zugegangen am 10. August 1905.)

Nach Beobachtungen von E. Fischer und P. Bergell<sup>2)</sup> zeigen die künstlichen Dipeptide gegenüber den Fermenten, die aus toter Pankreasdrüse extrahiert und unter dem Namen Trypsin oder Pankreatin in den Handel gebracht werden, scharfe Unterschiede. Die einen, wie Glycyl-glycin, werden nicht in nachweisbarer Menge angegriffen, während andere, wie das Glycyl-tyrosin, eine rasche Spaltung in die Komponenten erfahren. Besonders interessant gestaltete sich der Versuch beim racemischen Leucyl-alanin: denn die Hydrolyse erfolgt hier asymmetrisch, d. h. sie beschränkt sich auf die eine optisch-aktive Komponente des Racemkörpers. Die Ausdehnung dieser Untersuchungen auf die komplizierteren Polypeptide wurde damals durch die schlechte Beschaffenheit des käuflichen Pankreasfermentes und die dadurch bedingte Schwierigkeit, die Produkte der Hydrolyse zu isolieren, verhindert.

Durch die Güte des Herrn Prof. Pawlow in St. Petersburg sind wir inzwischen in den Besitz von reinem Pankreassaft gelangt, der von Hunden mittels einer Pankreasfistel ent-

<sup>1)</sup> Diese Mitteilung ist eine wesentliche Erweiterung der Abhandlung, welche wir am 23. Februar dieses Jahres der Akademie der Wissenschaften in Berlin vorlegten (Sitzungsberichte 1905, S. 290 u. Chemisches Zentralblatt, 1905, Bd. 1, S. 923), denn die Zahl der untersuchten Polypeptide ist von 12 auf 29 gestiegen, und die Versuche mit Magensaft sind dazu gekommen.

<sup>2)</sup> Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2592 (1903), u. XXXVII, S. 3103 (1904).

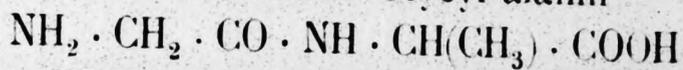
nommen war. Wir haben mit Hilfe dieses überaus wirksamen Fermentes eine ganze Reihe von Polypeptiden geprüft und fassen die Resultate in folgende Übersicht zusammen:

| Hydrolysierbar.                 | Nicht hydrolysierbar.            |
|---------------------------------|----------------------------------|
| * Alanyl-glycin.                | Glycyl-alanin.                   |
| * Alanyl-alanin.                | Glycyl-glycin.                   |
| * Alanyl-leucin A.              | Alanyl-leucin B.                 |
| * Leucyl-isoserin A.            | Leucyl-alanin.                   |
| Glycyl-l-tyrosin.               | Leucyl-glycin.                   |
| Leucyl-l-tyrosin.               | Leucyl-leucin.                   |
| * Alanyl-glycyl-glycin.         | Aminobutyryl-glycin.             |
| * Leucyl-glycyl-glycin.         | Aminobutyryl-aminobuttersäure A. |
| * Glycyl-leucyl-alanin.         | Aminobutyryl-aminobuttersäure B. |
| * Alanyl-leucyl-glycin.         | Aminoisovaleryl-glycin.          |
| Dialanyl-cystin.                | Glycyl-phenylalanin.             |
| Dileucyl-cystin.                | Leucyl-prolin.                   |
| Tetraglycyl-glycin.             | Diglycyl-glycin.                 |
| Triglycyl-glycin-ester (Curtius | Triglycyl-glycin.                |
| Biuretbase)                     | Dileucyl-glycyl-glycin.          |

Wie der Vergleich zwischen den beiden Reihen ergibt, ist der Angriff des Pankreasfermentes durch recht verschiedene Ursachen bedingt. Wir heben folgende Punkte hervor.

### 1. Einfluß der Struktur.

Alanyl-glycin  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$  wird gespalten, während das isomere Glycyl-alanin



indifferent ist. Wahrscheinlich gehört hierhin noch der Gegensatz zwischen Alanyl-leucin A und Leucyl-alanin, vorausgesetzt, daß dieser Fall nicht durch sterische Verschiedenheit bedingt ist.

### 2. Einfluß der einzelnen Aminosäuren.

Bei den Dipeptiden, bei denen die Verhältnisse am einfachsten liegen, wird die Hydrolyse befördert, wenn Alanin als Acyl fungiert, wie der Hinweis auf Alanyl-glycin, Alanyl-alanin und Alanyl-leucin zeigt. Eine ähnliche Wirkung haben die Oxy-säuren Tyrosin und Isoserin, wenn sie am Ende der Kette stehen. Vielleicht ist das dem elektronegativen Charakter dieser Aminosäuren zuzuschreiben. In ähnlicher Weise könnte die leichte

Hydrolyse der beiden Cystinderivate interpretiert werden, obschon man hier auch die längere Kette in Betracht ziehen muß. Bemerkenswert ist die Resistenz der Dipeptide, in denen  $\alpha$ -Aminobuttersäure,  $\alpha$ -Aminovaleriansäure und Leucin als Acyl fungieren, obschon die beiden letzten Aminosäuren in der Natur so sehr verbreitet sind.

### 3. Einfluß der Konfiguration.

Sämtliche in der ersten Spalte der Tabelle mit \* angeführten Polypeptide sind Racemkörper. Die Hydrolyse findet hier asymmetrisch statt, derart, daß nur die eine Hälfte des Racemkörpers angegriffen wird. Als Produkte der Hydrolyse resultieren stets diejenigen aktiven Aminosäuren, welche in den natürlichen Proteinstoffen enthalten sind. Einen besonderen Fall bietet hier der Gegensatz zwischen dem spaltbaren Alanyl-leucin A und dem nicht hydrolysierbaren Alanyl-leucin B. In diesen beiden Racemkörpern sind nach früheren Betrachtungen<sup>1)</sup> alle 4 Kombinationen der 4 aktiven Aminosäuren enthalten, d. h. der eine Racemkörper ist d-Alanyl-d-Leucin + l-Alanyl-l-Leucin, und der zweite d-Alanyl-l-Leucin + l-Alanyl-d-Leucin. Unsere Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß von den 4 aktiven Kombinationen nur eine und zwar das d-Alanyl-l-Leucin durch das Ferment angegriffen wird, daß mithin die Verbindung A der zweite Racemkörper ist. Wir zweifeln kaum daran, daß die Untersuchung der aktiven Dipeptide, deren Bereitung schon in Angriff genommen ist, den Schluß bestätigen wird. Diese Überlegung zeigt, daß man die Wirkung des Pankreassaftes für die Ermittlung der Konfiguration mancher Polypeptide benutzen kann.

### 4. Einfluß der Zahl der Aminosäuren.

Hier ist der Vergleich der verschiedenen Glycinkörper besonders lehrreich. Glycyl-glycin, Diglycyl-glycin und Triglycyl-glycin werden nicht angegriffen, während beim Tetraglycyl-glycin eine unverkennbare Spaltung eintritt. Merkwürdigerweise

<sup>1)</sup> E. Fischer, Berichte d. Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 243, 1904.

schließt sich ihm die Biuretbase an, die nach den neuen Untersuchungen von Curtius<sup>1)</sup> der Äthylester des Triglycyl-glycins ist. Auf die älteren Beobachtungen von Schwarzschild<sup>2)</sup> bezüglich der Spaltung dieser Base durch Trypsin werden wir später zurückkommen. Man ersieht aus diesem Vergleich, daß einerseits die Länge der Glycinkette, andererseits aber auch die Veränderung des Carboxyls von Einfluß auf die Hydrolyse ist. Die Länge der Kette macht sich auch deutlich bemerkbar bei dem Leucylglycylglycin, das im Gegensatz zum Leucylglycin gespalten wird. Daß andererseits Dileucyl-glycylglycin nicht hydrolysiert wird, liegt vielleicht an der Konfiguration der Dileucylgruppe.

##### 5. Einfluß der Beschaffenheit des Fermentes.

Für die älteren Versuche über Hydrolyse der natürlichen Proteinstoffe und der künstlichen Polypeptide hat man in der Regel das käufliche Trypsin oder Pankreatin benutzt. Diese Präparate werden bekanntlich durch Extraktion der toten und einige Zeit aufbewahrten Pankreasdrüse gewonnen. Sie können deshalb Enzyme enthalten, die dem normalen Pankreassaft fehlen. Als Beweis dafür, daß in der Tat ein Unterschied zwischen der Wirkung des frischen Pankreassaftes und den Pankreasauszügen besteht, können wir einen einfachen und überzeugenden Fall anführen. Das Leucyl-alanin, welches gegen frischen Pankreassaft ganz beständig ist, wird von Pankreatin partiell gespalten, wie der eine von uns in Gemeinschaft mit Bergell früher<sup>3)</sup> beobachtet hat, und wie wir durch eine Wiederholung des Versuches bestätigen konnten. Es liegt deshalb auf der Hand, daß alle maßgebenden Versuche über Wirkung der Pankreasfermente in Zukunft mit dem frischen Saft, der durch die glänzenden Methoden von Pawlow zugänglich geworden ist, angestellt werden müssen. Ob von den verschiedenen Fermenten, die dieser Saft nachweislich enthält,

<sup>1)</sup> Berichte d. Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 1284 (1904)

<sup>2)</sup> Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. IV, S. 155 (1903).

<sup>3)</sup> Berichte d. Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 3103 (1904).

nur eins oder mehrere für die Hydrolyse der Polypeptide oder auch der Proteinstoffe in Betracht kommen, und ob endlich der Saft von verschiedenen Tieren verschiedene Wirkungen hat, das sind Fragen, mit denen wir uns noch nicht beschäftigt haben. Wir möchten aber auf die Möglichkeit hinweisen, daß gerade durch Benutzung der künstlichen Polypeptide derartige Unterschiede vielleicht am bequemsten und schärfsten nachgewiesen werden können.

Auf Grund der jetzt vorliegenden Beobachtungen kann man die Behauptung aufstellen, daß die Prüfung mit Pankreassaft ein Mittel ist, die große Zahl der künstlichen Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen einzuteilen. Dieser Vorteil wird noch mehr hervortreten, sobald es gelingt, eine größere Zahl der optisch-aktiven Polypeptide in gleicher Weise zu untersuchen.

Der uns von Herrn Prof. Pawlow gelieferte Pankreassaft war durch die neue von Pawlow erfundene Fistel entnommen und daher frei von Darmsaft. Er war für den Transport mit einer geringen Menge Thymol versetzt. Bekanntlich ist der frische Pankreassaft hydrolytisch kaum wirksam. Er muß aktiviert werden. Wir haben zu dem Zwecke 5% Darmsaft zugesetzt, der uns ebenfalls von Prof. Pawlow überlassen war. Um dem Einwande zu begegnen, daß durch den Zusatz des Darmsaftes andere hydrolytische Fermente in die Flüssigkeit gelangt seien, die möglicherweise die Hydrolyse der Polypeptide bewirken könnten, so haben wir für einige typische Fälle spontan aktiv gewordenen Pankreassaft benutzt und dabei die gleichen Resultate erhalten. Der verwendete Pankreassaft war eine wasserklare Flüssigkeit und enthielt im Kubikzentimeter 0,03 bis 0,04 g Trockensubstanz, die zum Teil noch aus anorganischen Stoffen bestand und wegen ihrer geringen Menge die Untersuchung der hydrolytischen Produkte kaum erschwerte.

Bei der natürlichen Verdauung unterliegen die Proteinstoffe zunächst der Wirkung der Magenfermente. Wie weit hier die Hydrolyse geht, ist noch strittig. Während die meisten Beobachter angeben, daß sie im wesentlichen bei der Bildung von Albumosen und Peptonen stehen bleibe, finden sich in der

Literatur vereinzelte Angaben, daß auch kleine Mengen von Aminosäuren gebildet werden. Wir haben es deshalb nicht für überflüssig gehalten, die künstlichen Polypeptide der Wirkung von Magensaft zu unterwerfen, der aus einem nach Pawlow dargestellten kleinen Magen gewonnen war. Die bisherigen Untersuchungen erstrecken sich nur auf die folgenden 5 Dipeptide:

Glycyl-l-tyrosin

Dialanyl-cystin

Leucyl-alanin

Leucyl-glycin

Leucyl-leucin.

von denen die beiden ersten durch Pankreassaft sehr leicht, und die drei anderen gar nicht angegriffen werden. Das Resultat war in allen Fällen unter den später geschilderten Bedingungen negativ. Wir werden aber diese Versuche auf die komplizierteren Polypeptide ausdehnen in der Hoffnung, daß es so vielleicht gelingt, eine schärfere Grenze zwischen Magen- und Pankreasverdauung aufzufinden, denn die Benutzung der künstlichen Produkte hat den großen Vorteil, daß man mit einheitlichen Substanzen arbeiten kann, während man es beim Abbau der Proteinstoffe stets mit einem komplizierten, bisher ganz unentwirrbaren Gemisch der verschiedenartigsten Stoffe zu tun hat.

Mit Rücksicht auf die Mühen, die die Darstellung der künstlichen Polypeptide macht, haben wir nur kleine Mengen dieser Stoffe verwenden können. Infolge dessen war es nicht möglich, alle Produkte der Hydrolyse zu isolieren. Wir haben uns vielmehr in der Regel damit begnügt, das charakteristische Spaltprodukt zu gewinnen. Die Einzelheiten der Beobachtung finden sich bei jedem Beispiel erwähnt. Wir halten es aber für zweckmäßig, hier einen kurzen Überblick über die dabei benutzten Methoden zu geben, weil sie in ähnlichen Fällen Verwendung finden können.

#### Untersuchungsmethoden.

Für die qualitative Erkennung der Hydrolyse ist häufig die polarimetrische Untersuchung das bequemste Mittel. Wir haben deshalb bei allen Polypeptiden, welche Aminosäuren mit

asymmetrischen Kohlenstoffatomen enthalten, die Lösung nach dem Zusatz von Pankreassaft sofort optisch untersucht, und dann das Drehungsvermögen in Intervallen von ein bis mehreren Tagen von neuem bestimmt. An der eingetretenen Veränderung ließ sich der Verlauf der Hydrolyse verfolgen. Der Versuch wurde erst unterbrochen, wenn das Drehungsvermögen konstant geworden war. War das zu untersuchende Polypeptid ein Racemkörper, so zeigte die ursprüngliche Lösung trotz des Gehalts an Pankreassaft nur eine minimale Drehung und in allen Fällen, in denen diese Inaktivität blieb, konnten wir auch durch die chemischen Methoden keine Hydrolyse nachweisen. Eine Ausnahme bilden natürlich die Polypeptide, die aus Glycocoll zusammengesetzt sind, da hier keine optisch aktiven Produkte entstehen können.

Für den chemischen Nachweis der Spaltprodukte ist die Isolierung der einzelnen Substanzen unerlässlich. Am häufigsten handelt es sich um die Erkennung von Aminosäuren. Sind dieselben schwerlöslich, wie Tyrosin und Cystin, so krystallisieren sie während des Versuches aus den wässerigen Lösungen aus. In der Regel aber ist eine umständliche Operation für die Abscheidung notwendig. In solchen Fällen haben wir die Flüssigkeit nach Abtrennung des Toluols kurz aufgeköcht, um das Ferment zu zerstören, filtriert und unter stark vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Für die Trennung von Aminosäuren und Polypeptiden hat die Estermethode in den meisten Fällen am raschesten zum Ziele geführt. Zu dem Zwecke wurde das Gemisch mit der fünffachen Menge absoluten Alkohols übergossen, und gasförmige Salzsäure unter Kühlung bis zur Sättigung eingeleitet, dann gerade zum Aufkochen erwärmt und rasch wieder stark abgekühlt. War Glycocoll als Spaltprodukt zu erwarten, so wurde die Lösung mit einem winzigen Kriställchen von salzsaurem Glycocollester geimpft, und blieb dann in einer Kältemischung unter häufigem Reiben mehrere Stunden stehen. Der ausgeschiedene salzsaure Glycocollester wurde filtriert, mit eiskaltem Alkohol, später mit Äther gewaschen und nach dem Trocknen im Exsikkator gewogen. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol zeigte dieses Präparat stets

den Schmelzpunkt  $144^{\circ}$  und die Zusammensetzung  $C_4H_{10}NO_2Cl$ . So ließen sich auch geringe Mengen von Glycocoll isolieren.

Die salzsaure alkoholische Mutterlauge oder bei Abwesenheit von Glycocoll die ursprüngliche Veresterungsflüssigkeit wurde sofort bei sehr geringem Druck (12—15 mm) verdampft, und der Rückstand auf die freien Ester verarbeitet. Es ist dabei am vorteilhaftesten, die Hydrochlorate nicht durch wässrige Alkalien, sondern in methylalkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Natriummethylat zu zerlegen, durch vorsichtigen Zusatz von Äther das Kochsalz auszufällen, die methylalkoholische Mutterlauge wieder unter stark vermindertem Druck abzudestillieren und die Dämpfe in verdünnter Salzsäure aufzufangen. Hierbei geht der geringe Rest des Glycocollsters und der gesamte Ester des Alanins, dessen Menge bei solchen Versuchen immer relativ klein ist, völlig in das Destillat über. Beim Abdampfen desselben bleiben die Hydrochlorate der Aminosäuren, von denen das Salz des Alanins in bekannter Weise durch das Drehungsvermögen oder die Umwandlung in die freie Aminosäure indentifiziert werden kann.

Der Rückstand, der beim Verdampfen des Methylalkohols bleibt, enthält die Ester von höheren Aminosäuren und Polypeptiden. Laugt man ihn mit Petroläther aus, so gehen die Ester der einfachen Aminosäuren, wie Leucin, Phenylalanin, in Lösung, während die Polypeptidester zurückbleiben. Aus dem Gemisch der Polypeptidester lassen sich nun die Dipeptide recht bequem als Diketopiperazine isolieren. Zu dem Zwecke behandelt man mit alkoholischem Ammoniak und trennt nachher die Diketopiperazine, die nicht mehr basisch und in Wasser ziemlich schwer löslich sind, von den Derivaten der höheren Peptide.

Durch Kontrollversuche haben wir uns überzeugt, daß absichtlich hergestellte Gemische von Aminosäuren, Dipeptiden und Tripeptiden auf diese Weise recht gut getrennt werden können, und daß insbesondere auch bei vorsichtiger Ausführung der Operation keine Hydrolyse der Polypeptide stattfindet.

Selbstverständlich haben wir bei jeder Untersuchungsreihe die Wirksamkeit des Fermentes und die Abwesenheit von Bakterien durch besondere Kontrollversuche festgestellt.

**Hydrolysierbare Polypeptide.****Racemisches Alanyl-glycin<sup>1)</sup>.**

2 g Alanyl-glycin in 15 ccm Wasser gelöst wurden nach Zusatz von 5 ccm Pankreassaft und Toluol 14 Tage bei 36° aufbewahrt. Das Drehungsvermögen der Flüssigkeit war vom 10. Tage an konstant und betrug im 1dm-Rohr 1,5° nach links. Die Lösung wurde jetzt vom Toluol getrennt, kurz aufgeköcht, filtriert und im Vacuum bei 40° zur Trockene verdampft, der Rückstand mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen und unter Kühlung gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Zum Schluß wurde kurz aufgeköcht. Nach Einimpfen eines Kriställchens von Glycocollesterchlorhydrat und einigem Stehen auf Eis erfolgte bald reichliche Kristallisation, die sich im Verlauf von 12 Stunden noch beträchtlich vermehrte. Die abgesaugte, über Kalk und Schwefelsäure getrocknete Masse wog 0,5642 g. Sie schmolz nach dem Umlösen aus heißem Alkohol bei 144° (korr.).

0,1977 g Substanz gaben 0,1290 g H<sub>2</sub>O u. 0,2477 g CO<sub>2</sub>.

Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>Cl:

34,43% C u. 7,18% H.

Gefunden:

34,17% C u. 7,25% H.

Beim Verdampfen der Mutterlauge vom Glycocollesterchlorhydrat unter geringem Druck verblieb ein fester Rückstand, der aus den Hydrochloraten von Alaninester und Dipeptidester bestand. Wir haben uns mit der Isolierung der Aminosäure begnügt. Zu dem Zwecke wurde der Rückstand in 25 ccm reinem Methylalkohol gelöst, dann in 2 ccm maßanalytisch der Chlorgehalt bestimmt, und nun zu dem Rest der Flüssigkeit die berechnete Menge einer 2%igen methylalkoholischen Lösung von Natrium zugegeben. Um den größten Teil des Kochsalzes zu fällen, fügten wir etwas Äther hinzu, wobei aber darauf zu achten war, daß nicht mit dem Kochsalz auch Dipeptidester gefällt wird. Die filtrierte Flüssigkeit wurde nun unter einem Druck von 15 mm bei gewöhnlicher Temperatur abdestilliert.

<sup>1)</sup> E. Fischer und Walter Axhausen. Liebigs Annalen. Bd. CCCXL, S. 128 (1905).

und die Dämpfe in stark gekühlter verdünnter Salzsäure aufgefangen. Beim Verdampfen dieser salzsauren Lösung blieb ein kristallinischer Rückstand, der wieder in Wasser gelöst und durch Kochen mit Bleioxyd von Chlor befreit wurde. Nach Fällen des gelösten Bleis mit Schwefelwasserstoff gab das Filtrat beim Verdampfen 0,3412 g Alanin, das nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser bei 295° (korr.) unter Zersetzung schmolz.

0,2013 g Substanz gaben 0,1454 g H<sub>2</sub>O u. 0,2998 g CO<sub>2</sub>.

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

40,45% C u. 7,87% H.

40,6% C u. 8,02% H.

Bei einem zweiten Versuch mit 1 g Alanyl-glycin, der genau ebenso verlief, wurden 0,1721 g salzsaures Alanin erhalten, dessen optische Bestimmung zeigte, daß d-Alanin vorlag. 0,1102 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im 1 dm-Rohr Natriumlicht 0,19° nach rechts.  $[\alpha]_{20}^D = + 8,8^\circ$ .

Daß die Drehung etwas zu gering befunden ist, liegt wahrscheinlich an einer kleinen Verunreinigung des Präparates durch Glycocoll, dessen Entfernung als salzsaurer Ester bekanntlich nicht quantitativ ist.

#### Racemisches Alanyl-alanin<sup>1)</sup>.

1 g Alanyl-alanin wurde in 10 ccm Wasser gelöst, mit 3 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt und 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die vom Toluol getrennte, kurz aufgekochte und filtrierte Lösung drehte im 1 dm-Rohr 0,50° nach links. Sie wurde bei 40° im Vacuum zur Trockene verdampft, der Rückstand fein gepulvert, mit 5 ccm absoluten Alkohols übergossen, durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas unter Kühlung verestert und im Vacuum bei 35° wiederum eingedampft. Die Ester wurden in vorsichtiger Weise mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, mit Äther aufgenommen, und die ätherische Lösung im Vacuum bei gewöhnlicher Temperatur unter sehr sorgfältiger Kühlung der doppelten Vorlagen abdestilliert. Hierbei ging der Alaninester in das Destillat und ließ sich daraus durch verdünnte Salzsäure ausschütteln. Die

<sup>1)</sup> E. Fischer und Karl Kautzsch, Berichte d. Deutschen chem. Gesellschaft., Jg. XXXVIII, S. 2375 (1905).

salzsaure Lösung hinterließ beim Eindampfen 0,4125 g einer fast farblosen, kristallinen Masse, die nach der optischen Untersuchung fast reines salzsaures d-Alanin war.

0,2123 g in 5 ccm Wasser gelöst drehten Natriumlicht 0,38° nach rechts  $[\alpha]_{20}^D = +9,3^\circ$ .

Aus dem Hydrochlorat wurde das freie Alanin in der üblichen Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd hergestellt. Es zersetzte sich gegen 296° (korr.).

0,2211 g Substanz gaben 0,3275 g CO<sub>2</sub> u. 0,1571 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

40,45% C u. 7,87% H.

40,4% C u. 7,9% H.

Auf die Isolierung des nicht gespaltenen aktiven Alanylalanins, das wir als l, l-Verbindung betrachten, haben wir wegen der geringen Menge verzichten müssen. Unter der Voraussetzung, daß das racemische Alanylalanin zur Hälfte vollständig gespalten war, berechnet sich die Menge des salzsauren d-Alanins zu 0,785 g. Die obigen gefundenen 0,4125 g betragen mithin nur 52,5% der Theorie. Wir müssen aber bemerken, daß die Isolierung des Esters aus dem Hydrochlorat durch Alkali und Äther, die wir bei diesem älteren Versuch noch angewandt haben, nicht unerhebliche Verluste mit sich bringt.

#### Racemisches Alanyl-leucin.<sup>1)</sup>

Das angewandte Präparat war ein Gemisch der beiden Isomeren A und B. Da die reine Verbindung B von dem Pankreassaft nicht angegriffen wird, das Gemisch aber unverkennbare Hydrolyse zeigte, so muß die Spaltung bei der Verbindung A eingetreten sein. Eine Wiederholung der Versuche mit der reinen Verbindung A haben wir bisher aus Mangel an Material nicht ausführen können. Deshalb ist auch die Untersuchung der Spaltprodukte unvollständig geblieben.

0,5 g wurden in 10 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von Toluol und 4 ccm Pankreassaft 12 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die kurz aufgekochte, filtrierte Lösung drehte im 1 dm-Rohr 0,4° nach rechts. Die Lösung wurde bei 40° im Vacuum zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 1 ccm

<sup>1)</sup> E. Fischer und Otto Warburg, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL S. 152 (1905).

eiskaltem Wasser ausgelaugt. Der unlösliche Teil gab in heißem Wasser gelöst und mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht ein blaßblaues Kupfersalz, das ganz das Aussehen und die Eigenschaften des Leucinkupfers zeigte.

Racemisches Leucyl-isoserin A.<sup>1)</sup>

1 g Dipeptid wurde in 15 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft bei 37° aufbewahrt. Nach 7 Tagen drehte die Lösung 0,35° nach links. Nach weiteren 10 Tagen war die Drehung unverändert. Zur Isolierung der Spaltprodukte wurde die vom Toluol getrennte, aufgekochte und filtrierte Lösung unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur völlig zur Trockene verdampft, und der Rückstand mehrmals mit 50%igem Alkohol ausgekocht. Beim Erkalten des Filtrats schieden sich Kristalle ab, die in der äußeren Form, der geringen Löslichkeit in Wasser und in der Bildung eines blaßblauen, in Wasser äußerst schwer löslichen Kupfersalzes dem Leucin glichen. Der in verdünntem Alkohol unlösliche Teil wurde in Wasser heiß gelöst. Beim Abkühlen trat Kristallisation ein. Das mehrmals aus Wasser umgelöste Produkt schmolz gegen 245° (korr.) und zeigte die Zusammensetzung des Isoserins. Seine Menge betrug 0,2015 g.

0,1909 g Substanz gaben 0,2449 g CO<sub>2</sub> u. 0,1186 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>:

Gefunden:

34,26% C u. 6,73% H.

34,9% C u. 6,90% N.

Das Isoserin war optisch-aktiv, die Bestimmung des Drehungsvermögens wurde jedoch nicht ausgeführt.

Glycyl-l-tyrosin.<sup>2)</sup>

1 g Glycyl-l-tyrosin wurde in 20 ccm Wasser gelöst, mit 3 ccm aktiviertem Pankreassaft versetzt und nach Zugabe von Toluol im Brutraum bei 36° aufbewahrt. Nach 8 Stunden zeigte sich bereits eine deutliche Trübung der Lösung und ein leichter Bodensatz, der nach 12 Stunden sich stark vermehrt hatte. Nach 24 Stunden betrug die Menge des bei 100° ge-

<sup>1)</sup> E. Fischer und W. F. Koelker, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL, S. 172 (1905).

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2495 (1904).

trockneten Niederschlages 0,4 g. Das Filtrat gab nach weiterem Stehen im Brutraum eine neue, ziemlich beträchtliche Kristallisation, die nach 2 Tagen 0,25 g wog. Aus der Mutterlauge konnten trotz erneutem Zusatz von Pankreassaft und acht-tägigem Stehen im Brutraum nur noch 0,04 g desselben Produktes gewonnen werden. Das Rohtyrosin wurde durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle gereinigt.

0,1768 g Substanz gaben 0,0973 g H<sub>2</sub>O u. 0,3874 g CO<sub>2</sub>.

Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>:

Gefunden:

59,66 % C u. 6,07 % H.

59,7 % C u. 6,11 % H.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 0,62 g oder 81,6 % der Theorie.

Um das gleichzeitig entstandene Glycocoll nachzuweisen, wurde die vom Tyrosin abfiltrierte Lösung im Vacuum unterhalb 40° zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 3 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Beim Verdampfen des Filtrates blieben 0,28 g zurück. Da dem Glycocoll noch amorphe Produkte beigemischt waren, die die Kristallisation erschwerten, so diente zum endgültigen Nachweis sein Esterchlorhydrat. Es wurde deshalb die Masse gepulvert, mit 3 ccm absolutem Alkohol übergossen, und unter Eiskühlung mit Salzsäuregas gesättigt. Um die Veresterung zu vervollständigen, wurde zum Schluß die leicht getrübbte Lösung noch 1—2 Minuten erwärmt und dann sofort wieder abgekühlt. Nach Impfen mit einem Kriställchen von Glycocollesterchlorhydrat schied die in einer Kältemischung stehende Lösung ziemlich rasch einen dicken Kristallbrei ab, der nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen über Kalk und Schwefelsäure bei 144° schmolz und alle Eigenschaften des Glycocollesterchlorhydrats besaß. Seine Menge betrug 0,32 = 0,17 g Glykokoll oder 54,8 % der Theorie.

#### Leucyl-l-tyrosin.<sup>1)</sup>

Zur Verwendung kam das amorphe Präparat, dessen Einheitlichkeit nach der früheren Beschreibung nicht sichergestellt ist. 0,5 g wurden in 30 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2498 (1904).

Pankreassaft sowie Toluol bei  $36^{\circ}$  aufbewahrt. Nach 4 Tagen war eine reichliche Menge (0,25 g) von Kristallen abgeschieden, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser 0,15 g ziemlich reines Tyrosin gaben. Die vom Tyrosin möglichst befreite Mutterlauge gab nach dem Verdünnen und Kochen mit Kupferoxyd ein in blaßblauen Blättchen kristallisierendes Kupfersalz, das die größte Ähnlichkeit mit dem Leucinkupfer zeigte.

#### Racemisches Alanyl-glycyl-glycin.<sup>1)</sup>

2 g des Tripeptides in 20 ccm Wasser gelöst wurden mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt und bei  $36^{\circ}$  aufbewahrt. Nach 9 Tagen betrug die Drehung der Flüssigkeit im 1 dm-Rohr  $1,0^{\circ}$  nach links und blieb dann konstant. Zur Isolierung der Spaltprodukte wurde der Verdampfungsrückstand zunächst mit  $2\frac{1}{2}$  ccm eiskaltem Wasser zerrieben, rasch abgesaugt und scharf abgepreßt. Es waren 0,3512 g in Lösung gegangen. Die wiederholt in Wasser heiß gelöste und durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol gefällte Substanz schmolz gegen  $296^{\circ}$  (korr.) und besaß die Zusammensetzung des Alanins.

|   |                      |
|---|----------------------|
| 0,1943 g Substanz gaben 0,2875 g $\text{CO}_2$ u. 0,1362 g $\text{H}_2\text{O}$ . |                      |
| Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ :                                 | Gefunden:            |
| 40,45% C u. 7,87% H.  | 40,35% C u. 7,79% H. |

Der von eiskaltem Wasser nicht gelöste Teil der Spaltprodukte wurde nach dem Trocknen in der üblichen Weise esterifiziert, und die Ester auf die zuvor beschriebene Weise mit Natriummethylat in Freiheit gesetzt. Beim Abdestillieren der methylalkoholischen Lösung und Verdampfen des Destillates mit Salzsäure konnten noch 0,0815 g salzsaures Alanin gewonnen werden, das nach der optischen Untersuchung d-Verbindung war. Um das gleichzeitig entstandene Glycyl-glycin nachzuweisen, wurde das beim Verdampfen des Methylalkohols verbleibende Gemisch der Ester mit alkoholischem Ammoniak versetzt, und die Lösung auf dem Wasserbade verdampft. Als der Rückstand in wenig warmem Wasser gelöst war, schieden sich beim Erkalten die feinen Nadeln des Glycinanhydrids ab.

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2987 (1903).

|  |                    |
|--|--------------------|
| 0.1912 g Substanz gaben 0,2984 g CO <sub>2</sub> u. 0,0925 g H <sub>2</sub> O. |                    |
| Berechnet für C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :    | Gefunden:          |
| 42,10% C u. 5,26% H.   | 42,5% C u. 5,3% H. |

In methodischer Beziehung ist zu bemerken, daß bei Anwesenheit von Glycyl-glycin der Nachweis des Glycocolls als Esterchlorhydrat sehr erschwert ist, weil der salzsaure Ester des Dipeptides ebenfalls in kaltem Alkohol wenig löslich ist. In solchen Fällen ist es ratsam, die Ester mit Natriummethylat in Freiheit zu setzen und die Lösung abzudestillieren. Dabei geht der Glycocollester in das Destillat über und ist nur begleitet von den einfachen Aminosäuren, von denen er sich nun leicht als Esterchlorhydrat trennen läßt.

#### Racemisches Leucyl-glycyl-glycin.<sup>1)</sup>

Eine Lösung von 2 g Tripeptid in 20 ccm Wasser wurde mit 5 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt und bei 36° aufbewahrt. Die Flüssigkeit drehte im 1 dm-Rohr nach 11 Tagen 0,4° nach links, nach weiteren 7 Tagen betrug die Drehung — 0,62° und blieb dann konstant. Die Lösung wurde jetzt nach Entfernung des Toluols kurz mit Tierkohle aufgeköcht, filtriert, im Vacuum zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit 8 ccm absolutem Alkohol und Salzsäure verestert. Beim längeren Stehen der alkoholischen Lösung bei 0° erfolgte eine ziemlich reichliche Abscheidung von Kristallen, die mit Alkohol und Äther gewaschen und nochmals aus heißem Alkohol umkristallisiert wurden. Ihre Menge betrug 0,615 g. Das Präparat hatte die Eigenschaften des salzsauren Glycylglycinesters. Da aber die Analyse keine scharfen Zahlen gab, so wurde er mit alkoholischem Ammoniak übergossen, erwärmt, und die Lösung eingedampft. Hierbei schied sich bald Glycinanhydrid aus, das nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser folgende Zahlen gab:

|  |                     |
|--|---------------------|
| 0,1210 g Substanz gaben 0,1870 g CO <sub>2</sub> u. 0,0599 g H <sub>2</sub> O. |                     |
| Berechnet für C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :    | Gefunden:           |
| 42,10% C u. 5,26% H.   | 42,15% C u. 5,5% H. |

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2990 (1903).

Das Filtrat vom Glycylglycinesterchlorhydrat wurde im Vacuum zur Trockene verdampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und in üblicher Weise mit Alkali und Kaliumcarbonat die Ester in Freiheit gesetzt. Ihre ätherische Lösung wurde in sorgfältig gekühlte Vorlagen bei 12 mm Druck und gewöhnlicher Temperatur abdestilliert. Da das Destillat beim Abdampfen mit Salzsäure nur einen äußerst geringen Rückstand hinterließ, so war kein Ester der niederen Aminosäuren vorhanden. Wäre Glycocoll durch die Hydrolyse entstanden, so hätte man wenigstens eine kleine Menge hiervon finden müssen. Der beim Abdestillieren des Äthers bleibende ölige Rückstand bestand aus Leucinester. Er wurde durch Kochen mit Wasser verseift. Die Menge des erhaltenen Leucins betrug 0,2104 g. Das Präparat zeigte die äußere Form und die Zusammensetzung des Leucins.

0,1856 g Substanz gaben 0,1607 g H<sub>2</sub>O u. 0,3715 g CO<sub>2</sub>.

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

54,9% C u. 9,8% H.

54,6% C u. 9,6% H.

Da es ferner in 20% iger Salzsäure die spezifische Drehung  $[\alpha]_{20}^D + 14,9^\circ$  hatte, so handelt es sich um das natürliche l-Leucin.

#### Racemisches Glycyl-leucyl-alanin.

Eine Lösung von 2 g Tripeptid in 40 ccm Wasser, die mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft vermischt war, drehte nach 10tägigem Stehen bei 36° im 1 dm-Rohr 0,62° nach rechts. Die Drehung änderte sich im Verlauf von 49 Tagen nicht mehr. Nach Abtrennung des Toluols, kurzem Aufkochen und Filtrieren wurde die Lösung im Vacuum bei 40° völlig zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 2½ ccm eiskaltem Wasser verrieben, rasch abgesaugt und scharf abgepreßt. Das Filtrat hinterließ beim Verdampfen 0,35 g einer festen Masse, die in 2½ ccm absolutem Alkohol suspendiert und durch Salzsäuregas esterifiziert wurde. Nach dem Impfen mit einem Kriställchen von Glycocoll-esterchlorhydrat schied sich beim längeren Stehen in einer Kältemischung eine geringe Menge von Kristallen (0,01 g) ab, die bei 142° schmolzen und somit aller Wahrscheinlichkeit nach

Glycocollesterchlorhydrat waren. Die salzsaure alkoholische Mutterlauge vereinigten wir jetzt mit dem Teil der Spaltungsprodukte, der durch die 2½ ccm eiskaltes Wasser nicht gelöst war, fügten noch 3 ccm absoluten Alkohol zu und sättigten die Flüssigkeit unter Kühlung mit trockenem Salzsäuregas. Zum Schluß wurde ganz kurze Zeit aufgeköcht, und dann unter vermindertem Druck unter 40° zur Trockne verdampft. Im Rückstand haben wir einerseits d-Alanin und andererseits Glycyl-leucin nachgewiesen unter Benutzung derselben Methode, die beim Alanyl-glycyl-glycin beschrieben wurde. Die Menge des aus dem destillierten Ester gewonnenen salzsauren Alanins betrug 0,1721 g. Hiervon drehten 0,1102 g in 5 ccm Wasser gelöst im 1 dm-Rohr Natriumlicht 0,19° nach rechts, woraus sich  $[\alpha]_D^{20} = + 9^\circ$  berechnet.

Der nicht destillierte Teil der Ester wurde in alkoholischem Ammoniak gelöst und damit gekocht. Schon beim Abkühlen fiel Leucylglycinanhydrid aus, das nach dem Umlösen aus heißem Wasser bei 245° schmolz und folgende Zahlen gab:

0,1948 g Substanz gaben 0,4006 g CO<sub>2</sub> u. 0,1489 g H<sub>2</sub>O.

0,1900 » » » 27,4 ccm N [20°, 758 mm].

Berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:

Gefunden:

56,47% C, 8,24% H u. 16,47% N. 56,08% C, 8,5% H u. 16,45% N.

Das Präparat zeigte keine optische Aktivität, obschon es aller Wahrscheinlichkeit nach aus einem optisch aktiven Dipeptid entstanden war.

#### Alanyl-leucyl-glycin.<sup>1)</sup>

Wir haben zwei Versuche ausgeführt, jedesmal mit 2 g Tripeptid, das in 20 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 5 ccm Pankreassaft versetzt und 8 bzw. 10 Tage im Brutraum aufbewahrt wurde. Die vom Toluol getrennte, kurz aufgeköchte und filtrierte Lösung drehte im 1 dm-Rohr das eine Mal 2,2°, das andere Mal 2,1° nach rechts. Sie wurde im Vacuum unterhalb 40° zur Trockne verdampft. Für die Untersuchung des Rückstandes haben wir dann zwei verschiedene Methoden benutzt, die beide verdienen, ausführlich beschrieben zu werden.

<sup>1)</sup> E. Fischer u. Arnold Brunner, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL, S. 142 (1905).

a) Der Rückstand wurde mit 4 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Das wässrige Filtrat hinterließ beim Eindampfen 0.79 g, die jetzt nur mit 1 ccm eiskaltem Wasser verrieben wurden, wobei 0,5 g in Lösung gingen. Der beim Verdampfen des Filtrates verbleibende Rückstand enthielt das durch die Hydrolyse entstandene d-Alanin. Für seine völlige Reinigung haben wir es nach der mehrfach beschriebenen Methode in den Ester verwandelt, wobei gleichzeitig, aber vergebens, auf Glycocoll-ester geprüft wurde. Aus dem Hydrochlorat wurden die Ester mit Alkali und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, durch Äther extrahiert, der Äther abdestilliert, und das Destillat mit verdünnter Salzsäure durchgeschüttelt und zur Trockene verdampft. Der Rückstand war salzsaures d-Alanin und wog 0.2669 g oder 55% der Theorie, wenn man annimmt, daß nur die eine Hälfte des racemischen Tripeptides völlig gespalten wird.

0.2014 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im Dezimeterrohr Natriumlicht  $0,37^\circ$  nach rechts, mithin  $[\alpha]_{20}^D = + 9,5^\circ$ .

Aus dem salzsauren Salz wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit Bleioxyd das freie Alanin bereitet. Es zeigte bei raschem Erhitzen den Schmelz- und Zersetzungspunkt  $296^\circ$  (korr.) und die Zusammensetzung des Alanins:

0.1317 g Substanz gaben 0,1959 g  $\text{CO}_2$  u. 0,0953 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ :

40,45% C u. 7,87% H.

Gefunden:

40,56% C u. 8,04% H.

Die durch Auslaugen mit 4 ccm eiskaltem Wasser von d-Alanin befreite Masse enthielt das Dipeptid und noch andere stark aktive Substanzen, wahrscheinlich das aktive Tripeptid. Als die ganze Menge nämlich in 30 ccm Wasser gelöst war, drehte diese Flüssigkeit im 1 dm-Rohr  $1,2^\circ$  nach rechts. Wir haben uns damit begnügt, aus dem Gemenge das Leucylglycin zu isolieren. Zu dem Zwecke wurde das trockene Gemisch bei gewöhnlicher Temperatur mit 4 ccm Wasser sorgfältig ausgelaugt, wobei der größere Teil in Lösung ging. Der Rückstand enthielt das gesuchte Dipeptid. Er wurde in wenig heißem Wasser gelöst, die Flüssigkeit durch Aufkochen mit Tierkohle entfärbt, und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wog 0,1613 g und zeigte ungefähr die spezifische Drehung  $- 3,7^\circ$ . Er wurde

nochmals in wenig heißem Wasser gelöst, und die Flüssigkeit im Exsikkator eingeengt. Dabei schied sich die Substanz als farbloses, kristallinisches Pulver ab. Nach der Analyse ist das Produkt ein Leucylglycin:

|  |                             |                            |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| 0,1406 g Substanz gaben  | 0,2616 g CO <sub>2</sub> u. | 0,1077 g H <sub>2</sub> O. |
| Berechnet für C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> : | Gefunden:                   |                            |
| 51,06% C u. 8,51% H.   | 50,74% C u. 8,51% H.        |                            |

Allerdings ist es fraglich, ob wir das Präparat bei der geringen Menge und der unvollkommenen Art der Isolierung ganz rein gehabt haben. Das ist der Grund, warum keine genauere Bestimmung des Drehungsvermögens ausgeführt wurde. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, begann es gegen 228° zu sintern, färbte sich dann braungelb und schmolz unter starkem Aufschäumen bis gegen 238° (korr. 246°). Die geschmolzene Masse erstarrte beim Erkalten zu mikroskopisch feinen Nadelchen, die wahrscheinlich das Anhydrid des Dipeptides sind.

b) Der Rückstand wurde direkt mit 8 ccm absolutem Alkohol übergossen, unter Eiskühlung Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet und zum Schluß kurz aufgeköcht. Da die klare Lösung auch beim längeren Stehen in einer Kältemischung und nach erfolgter Impfung kein Glycocollesterchlorhydrat abschied, so wurde sie unter geringem Druck unterhalb 35° zur Trockene verdampft, und der Rückstand in 50 ccm Methylalkohol gelöst. Nachdem in 5 ccm dieser Flüssigkeit der Chlorgehalt titrimetrisch ermittelt war, fügten wir zum Rest der Lösung die berechnete Menge einer 2%igen methylalkoholischen Lösung von Natrium und versetzten dann noch zur Fällung des Kochsalzes mit einer mäßigen Menge Äther. Die jetzt filtrierte Flüssigkeit wurde unter geringem Druck abdestilliert. Das Destillat gab beim Verdampfen mit verdünnter Salzsäure 0,2511 g salzsaures d-Alanin.

0,2005 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im 1 dm-Rohr Natriumlicht 0,35° nach rechts.  $[\alpha]_{20}^D = +9,08^\circ$ .

Der beim Abdestillieren des Methylalkohols bleibende Rückstand enthielt die Ester des Leucylglycins und des nicht gespaltenen Tripeptids. Er wurde in alkoholischem Ammoniak gelöst, und die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt. Hierbei ver-

wandelte sich der Leucylglycinester in Leucylglycinanhydrid, das in Alkohol schwerlöslich ist und deshalb beim Abkühlen als voluminöse kristallinische Masse ausfiel. Es wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus kochendem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Es bildete dann mikroskopisch feine, meist kugelförmig vereinigte Nadelchen, die den richtigen Schmelzpunkt  $246^{\circ}$  (korr.) des Leucylglycinanhydrids zeigten. Seine Menge betrug 0,2523 g.

0,1213 g Substanz gaben 0,2493 g  $\text{CO}_2$  u. 0,0901 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$ :

56,47% C u. 8,24% H.

Gefunden:

56,05% C u. 8,25% H.

Das Präparat war optisch inaktiv im Gegensatz zu dem aktiven Dipeptid, das im vorigen Versuche beschrieben ist. Die vom Leucylglycinanhydrid abfiltrierte alkoholische Mutterlauge gab beim Eindampfen eine weitere Kristallisation des Anhydrids, und schließlich hinterblieb ein Gemisch, aus dem es uns nicht gelang, das aktive, nicht hydrolysierbare Tripeptid zu isolieren.

#### Dialanyl-cystin.<sup>1)</sup>

Eine Lösung von 1 g in 15 ccm Wasser, die mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt war, zeigte nach 12stündigem Stehen bei  $36^{\circ}$  bereits einen deutlichen Bodensatz, und nach 4 Tagen betrug die Menge des kristallisierten Niederschlages 0,35 g. Das Filtrat gab nach weiteren 5 Tagen im Brutraum noch 0,1 g, und aus der etwa auf die Hälfte eingeeengten Mutterlauge fielen beim Abkühlen noch 0,18 g aus. Der Niederschlag bestand zum größten Teil aus Cystin. Zur Reinigung wurde er in wenig warmem 10%igen Ammoniak gelöst, und die erkaltete Flüssigkeit durch Essigsäure gefällt. Die Menge des so erhaltenen Cystins betrug 0,5 g oder 79% der Theorie. Die Reinheit wurde durch eine Schwefelbestimmung festgestellt.

0,2012 g Substanz gaben 0,3915 g  $\text{BaSO}_4 = 0,0538$  g S.

Berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$

26,66% S.

Gefunden:

26,74% S.

<sup>1)</sup> E. Fischer und U. Suzuki, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., J. XXXVII, S. 4579 (1904).

Dileucyl-cystin.<sup>1)</sup>

Leider stand uns nur eine sehr geringe Menge Material zur Verfügung. Immerhin dürfte der Versuch in der Hauptsache entscheidend sein. 0,2 g amorphes Dileucyl-cystin in 10 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 1 ccm Pankreassaft versetzt, gab bei siebentägigem Stehen bei 36° 0,1 g kristallinen Niederschlag. Dieser wurde in der üblichen Weise gereinigt, und so 0,06 g eines Präparats erhalten, das die charakteristische Kristallform und auch die sonstigen Eigenschaften des Cystins zeigte.

Tetraglycyl-glycin.<sup>2)</sup>

Das Pentapeptid ist in kaltem Wasser so schwer löslich, daß wir für den Versuch eine nur 1%ige Lösung anwenden mußten. 100 ccm davon blieben mit 4 ccm Pankreassaft und mit Toluol im Brutraum bei 36° stehen. Nach 3 Wochen war die Biuretreaktion zwar noch nicht vollständig verschwunden, aber doch sehr viel schwächer geworden als die der Kontrollprobe oder einer frischen 1%igen Lösung des Pentapeptids. Die Flüssigkeit wurde nun zum Nachweis des Glycocolls genau in derselben Weise behandelt wie bei Alanyl-leucyl-glycin unter a. Die Menge der in 2 ccm eiskaltem Wasser löslichen Substanz betrug 0,3122 g, und daraus wurden 0,3014 g Glycocollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° gewonnen.

0,1976 g Substanz gaben 0,2500 g CO<sub>2</sub> u. 0,1290 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>Cl:

Gefunden:

34,43% C u. 7,18% H.

34,50% C u. 7,25% H.

Die übrigen Produkte der Hydrolyse sind noch nicht genügend untersucht.

## Triglycyl-glycin-äthylester (Biuretbase von Curtius).

Das Verhalten der Base gegen Trypsin ist bereits von M. Schwarzschild<sup>3)</sup> untersucht worden. Er fand, daß bei

<sup>1)</sup> E. Fischer und U. Suzuki, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 4579 (1904).

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2507 (1904).

<sup>3)</sup> a. a. O.

der Einwirkung des Fermentes die Biuretreaktion verschwand, und daß dann in der Flüssigkeit Glycocoll enthalten war. Er glaubte ferner die Base als den Äthylester des Hexaglycylglycins betrachten zu dürfen. In einer kurzen Kritik der Versuche und Schlußfolgerungen von Schwarzschild hat der eine von uns in Gemeinschaft mit Bergell<sup>1)</sup> darauf aufmerksam gemacht, daß die Struktur der Base auch durch die Versuche von Schwarzschild keineswegs festgestellt sei, und daß durch den Nachweis des Glycocolls die Hydrolyse der Base nicht bewiesen werde, da diese nach den älteren Versuchen von Curtius und Goebel selbst leicht in Glycocoll verwandelt werden könne. Inzwischen hat Th. Curtius<sup>2)</sup> gezeigt, daß die reine Biuretbasis der Äthylester des Triglycylglycins ist, und daß das von Schwarzschild benutzte Präparat sehr stark mit Glycinanhydrid verunreinigt war. Unter diesen Umständen schien eine Wiederholung des hydrolytischen Versuches unter Anwendung von Pankreassaft wünschenswert.

1 g Base, die nach der neuen Vorschrift von Curtius hergestellt war, wurde in 30 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt und im Brutraum aufbewahrt. Nach 14 Tagen war die Biuretreaktion noch deutlich vorhanden. Im Laufe der dritten Woche wurde sie aber schon recht schwach und nach vier Wochen war sie eben noch wahrnehmbar, während eine Kontrollprobe der Base ohne Ferment bei gleicher Behandlung nach sechs Wochen noch sehr starke Biuretreaktion zeigte. Wenn Schwarzschild bei seinen Versuchen die Biuretreaktion schon am 5. oder 6. Tage verschwinden sah, so liegt dies vielleicht an der größeren Menge oder auch an der verschiedenen Beschaffenheit seines Fermentes, das aus Rinderpankreas nach 5—6tägiger Autodigestion gewonnen und mittels der Uranylacetatmethode gereinigt war, aber vielleicht trotzdem neben den pankreatischen auch autolytische Fermente enthielt.

Zum Nachweis des Glycocolls wurde die biuretfreie Flüssigkeit vom Toluol getrennt, kurz aufgeköcht, filtriert, dann unter stark vermindertem Druck unterhalb 40° zur Trockene ver-

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2607 (1903).

<sup>2)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 1284 (1904).

dampft, und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser sorgfältig ausgelaugt. Beim Verdunsten hinterließ diese Lösung 0,354 g Rückstand. Er wurde gepulvert, mit 3 ccm absolutem Alkohol versetzt und durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas anfangs unter Kühlung bis zur Sättigung verestert. Da ein geringer Rückstand blieb, so wurde die alkoholische Lösung filtriert. Beim längeren Stehen des Filtrates in einer Kältemischung nach Impfung mit einem winzigen Kriställchen von Glycocollesterchlorhydrat begann eine reichliche Abscheidung von Kristallen, die nach 12 Stunden abfiltriert und mit kaltem Alkohol gewaschen 0,2045 g betrug und nach dem Schmelzpunkt  $142^{\circ}$  und den sonstigen Eigenschaften salzsaures Glycocollesterchlorhydrat waren.

Unsere Resultate bestätigen also die Beobachtungen von Schwarzschild über die Zerstörung der Biuretbasis durch das Pankreasferment und geben außerdem den sicheren Beweis, daß dabei Glycocoll entsteht. Allerdings ist seine Menge so gering, daß als Hauptprodukt andere Substanzen entstehen müssen. In der Tat bleibt beim Auslaugen des Glycocolls mit eiskaltem Wasser ein erheblicher Rückstand, der uns aus den abiureten Polypeptiden des Glycocolls zu bestehen scheint, den wir aber noch nicht genügend untersucht haben.

### Nicht hydrolysierbare Polypeptide.

#### Racemisches Glycyl-alanin.<sup>1)</sup>

Angewandt 1 g Dipeptid, 10 ccm Wasser, 3 ccm Pankreassaft. Nach 18 tägigem Stehen im Brutraum war die Lösung optisch gänzlich inaktiv und aus der in der üblichen Weise von Toluol befreiten, aufgekochten und filtrierten Flüssigkeit wurden 0,87 g unverändertes Dipeptid vom Schmelzpunkt  $227^{\circ}$  (korr.) wiedergewonnen.

|   |                      |
|---|----------------------|
| 0,1911 g Substanz gaben 0,2910 g $\text{CO}_2$ u. 0,1200 g $\text{H}_2\text{O}$ . |                      |
| Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ :                     | Gefunden:            |
| 41,53% C u. 6,9% H.   | 41,53% C u. 6,98% H. |

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII. S. 2489, 1904.

Ein zweiter Versuch unter denselben Bedingungen verlief ebenso. Hier wurde die recht scharfe Probe auf Glycocoll bezw. sein Esterchlorhydrat angestellt, blieb aber negativ.

#### Glycyl-glycin.

Seine Widerstandsfähigkeit gegen das gewöhnliche käufliche Trypsin ist schon früher<sup>1)</sup> beobachtet worden. In Übereinstimmung damit steht das Verhalten gegen Pankreassaft. Eine Lösung von 1 g in 25 ccm Wasser wurde mit 3 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt. Nach 14tägigem Stehen bei 36° war keine wägbare Menge von Glycocoll nachweisbar.

#### Racemisches Alanyl-leucin B.<sup>2)</sup>

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 10 ccm Wasser mit 3 ccm Pankreassaft unter Zusatz von Toluol war nach vierwöchentlichem Stehen im Brutraum optisch inaktiv. Trotzdem wurde sie nach Entfernung des Toluols kurz aufgeköcht, filtriert und verdampft, der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt, und der hierbei in Lösung gegangenen Teil auf die flüchtigen Ester der einfachen Aminosäuren verarbeitet. Das Resultat war gänzlich negativ. Ein zweiter Versuch verlief genau ebenso.

#### Racemisches Leucyl-alanin.<sup>2)</sup>

Wegen der geringen Löslichkeit wurden 1 g Dipeptid in 60 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft im Brutraum aufbewahrt. Nach 6 Wochen war die Flüssigkeit noch optisch inaktiv, und es konnte daraus 0,8105 g unverändertes Dipeptid zurückgewonnen werden. Zweimalige Wiederholung des Versuches führte zu demselben Resultate.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, übt das käufliche Pankreatin auf das Dipeptid deutlich hydrolysierbare Wirkung aus, wie folgender Versuch zeigt.

<sup>1)</sup> E. Fischer und P. Bergell, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., L. XXXVI, S. 2598, 1903.

<sup>2)</sup> E. Fischer u. Otto Warburg, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL, S. 152, 1905.

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 55 ccm Wasser wurde mit 0,2 g Pankreatin (von der Firma Rhenania in Aachen) geschüttelt, filtriert, und die Flüssigkeit nach Zusatz von Toluol im Brutraum aufbewahrt. Beim Beginn des Versuches drehte die Lösung im 1-dm-Rohr  $0,23^\circ$  nach links. Nach 12 Tagen war die Drehung auf  $0,10^\circ$  zurückgegangen. Die Flüssigkeit wurde dann nach Abtrennung des Toluols kurz aufgekocht, filtriert und bei geringem Druck unterhalb  $40^\circ$  zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit 2 ccm eiskaltem Wasser sorgfältig ausgelaugt, und der ungelöste Teil auf die gewöhnliche Art in das Kupfersalz verwandelt. Aus der eingeeengten Lösung schieden sich 0,0812 g eines blaßblauen Kupfersalzes ab, das nach dem äußeren Aussehen, der Löslichkeit und der Analyse sicherlich der Hauptmenge nach Leucinkupfer war.

|   |           |
|---|-----------|
| 0,0804 g Substanz gaben 0,0210 g CuO = 0,0167 g Cu. |           |
| Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ :               | Gefunden: |
| 19,6% Cu.   | 20,7% Cu. |

Die Menge des Salzes war verhältnismäßig gering. Wir haben bereits darauf aufmerksam gemacht, daß die Hydrolyse wohl durch den Gehalt des Pankreatins an anderen, dem Pankreassaft fremden Enzymen bewirkt werde.

#### Racemisches Leucyl-glycin.<sup>1)</sup>

1 g Dipeptid in 35 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt und 14 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die Flüssigkeit zeigte keine optische Aktivität. Durch Eindampfen wurde das unveränderte Dipeptid wieder gewonnen, und in der letzten Mutterlauge konnte durch die Estermethode kein Glycocoll nachgewiesen werden. Bei einem zweiten Versuch unter denselben Bedingungen und einem dritten, der ebenso ausgeführt war, aber 3 Wochen dauerte, war das Resultat dasselbe. Bei dem vierten Versuch wurden 4 g Dipeptid in 125 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 14 ccm Pankreassaft versetzt und im Brutraum aufgehoben. Nach 30 Tagen war die Lösung noch optisch inaktiv. Nach weiteren 18 Tagen hatte

<sup>1)</sup> E. Fischer und A. Brunner, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL, S. 142, 1905.

sie allerdings ein ganz geringes Drehungsvermögen erhalten, d. h. im 1-dm-Rohr  $0,05^\circ$  nach links. Der allergrößte Teil des Dipeptides wurde auch hier unverändert zurückgewonnen. Als aber der am leichtesten lösliche Teil des Verdampfungsrückstandes mit der Estermethode auf Glycocoll geprüft wurde, gelang es, 0,11 g Glycocollesterchlorhydrat zu isolieren. Hier war also eine ganz geringe Hydrolyse eingetreten. Wir müssen es aber unentschieden lassen, ob sie durch das Pankreasferment herbeigeführt wurde, denn bei so lang andauernder Wirkung und der Temperatur von  $36^\circ$  kann vielleicht auch schon Wasser allein eine schwache hydrolytische Wirkung ausüben.

### Racemisches Leucyl-leucin.<sup>1)</sup>

Wegen der geringen Löslichkeit mußten hier auf 1 g Dipeptid 100 ccm Wasser verwendet werden. Diese Lösung blieb mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt 4 Wochen bei  $36^\circ$  stehen. Die Flüssigkeit war auch zum Schluß optisch inaktiv und durch Verdampfen konnte das Dipeptid fast quantitativ zurückerhalten werden.

0,1201 g Substanz gaben 0,2617 g  $\text{CO}_2$  u. 0,1061 g  $\text{H}_2\text{O}$ :

Berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ :

59,02 % C u. 9,84 % H.

Gefunden:

59,4 % C u. 9,8 % H.

Zweimalige Wiederholung des Versuches unter denselben Bedingungen gab dasselbe Resultat.

Da Leucin in den natürlichen Proteinstoffen fast ausnahmslos und häufig in erheblicher Menge vorkommt, so durfte man erwarten, daß seine Polypeptide durch das Pankreasferment besonders leicht angegriffen würden. Wir vermuten deshalb, daß im vorliegenden Falle die Konfiguration des Moleküls das hindernde Moment ist. Wahrscheinlich ist nur die Kombination l-Leucyl-l-Leucin für das Ferment angreifbar, und diese kann in dem vorliegenden Racemkörper fehlen. Leider ist das zweite von der Theorie vorgesehene racemische Leucyl-leucin noch unbekannt.

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2491, 1904.

### Racemisches Aminobutyryl-glycin.<sup>1)</sup>

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 10 ccm Wasser blieb nach Zusatz von 4 ccm Pankreassaft und Toluol 14 Tage im Brutraum. Sie war dann noch inaktiv, und in der Flüssigkeit konnte nach dem Verdampfen im Vacuum durch die scharfe Estermethode kein Glycocoll nachgewiesen werden.

### Racemische Aminobutyryl-aminobuttersäure A.<sup>1)</sup>

1 g Dipeptid, 25 ccm Wasser und 3 ccm Pankreassaft mit Toluol bei 37° aufbewahrt. Nach 4 Wochen war die Lösung noch optisch inaktiv, und es konnten daraus 0,85 g unverändertes Dipeptid zurückgewonnen werden. Das isolierte Produkt bräunte sich gegen 265° (korr.) und schmolz gegen 272° (korr.).

### Racemische Aminobutyryl-aminobuttersäure B.<sup>1)</sup>

Der Versuch wurde unter genau denselben Bedingungen wie der vorhergehende ausgeführt. Das Resultat war ebenso negativ. Die Menge des zurückgewonnenen reinen Dipeptids betrug 0,875 g. Es bräunte sich beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 246° (korr.) und schmolz gegen 256° (korr.).

### Racemisches Aminoisovaleryl-glycin.<sup>2)</sup>

Eine Lösung von 1 g in 35 ccm Wasser mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft blieb 14 Tage im Brutraum stehen. Sie war dann optisch inaktiv und in der Flüssigkeit konnte durch die Estermethode kein Glycocoll gefunden werden.

### Glycyl-phenylalanin.<sup>3)</sup>

Angewandt 1 g Dipeptid, 20 ccm Wasser, 3 ccm Pankreassaft und Toluol. Nach vierwöchigem Stehen bei 36° zeigte die

<sup>1)</sup> E. Fischer und Karl Raske, Liebigs Annalen, Bd. CCCXL S. 180, 1905.

<sup>2)</sup> Die Verbindung wurde im hiesigen Institute von Herrn Schenkel nach der allgemeinen Methode aus  $\alpha$ -Bromisovaleriansäure und Glycocoll dargestellt und wird später beschrieben werden.

<sup>3)</sup> H. Leuchs und U. Suzuki, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. XXXVII, S. 3313, 1904.

Lösung keine Drehung des polarisierten Lichtes. Sie wurde dann im Vacuum zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Diese Lösung hinterließ beim Verdampfen 0,1902 g Rückstand, aus dem kein Glycocollesterchlorhydrat gewonnen werden konnte. Es war also keine nachweisbare Hydrolyse eingetreten.

#### Racemisches Leucyl-prolin.<sup>1)</sup>

Eine Lösung von 1 g in 10 ccm Wasser blieb nach Zusatz von Toluol und 3 ccm Pankreassaft bei 36° stehen. Nach 3 Wochen zeigte die Flüssigkeit keine Drehung des polarisierten Lichtes, und eine Probe blieb nach dem Kochen mit Kupferoxyd völlig farblos. Damit ist unzweideutig bewiesen, daß keine Hydrolyse des Dipeptides stattgefunden hatte, denn die Spaltungsprodukte, die dabei entstehen müssten, Leucin und Prolin, geben beide stark blau gefärbte Kupfersalze. Die ursprüngliche Flüssigkeit wurde dann nochmals mit 3 ccm Pankreassaft versetzt und wiederum 3 Wochen im Brutraum aufbewahrt. Auch jetzt blieb die Kupferprobe negativ, und man kann deshalb sagen, daß das Dipeptid von dem Pankreassaft gar nicht angegriffen wird. Ob das an der eigentümlichen Struktur der Verbindung liegt, die wahrscheinlich auch das abweichende Verhalten gegen Kupferoxyd bedingt, oder ob ihr stereochemischer Aufbau dem Ferment nicht paßt, müssen wir vorderhand unentschieden lassen, denn das zweite von der Theorie vorgesehene stereoisomere Leucylprolin ist noch unbekannt, und man kann a priori über sein Verhalten gegen Pankreasferment nichts sagen.

#### Diglycyl-glycin.<sup>2)</sup>

Eine Lösung von 1 g in 35 ccm Wasser mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft war 14 Tage im Brutraum aufbewahrt worden. Auch hier war Glycocoll durch die Estermethode nicht nachweisbar.

<sup>1)</sup> E. Fischer und Emil Abderhalden, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 3074 (1904).

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2983, 1903 und Jg. XXXVII, S. 257, 1904.

Triglycyl-glycin.<sup>1)</sup>

Die Versuche mit diesem Tetrapeptid wurden besonders sorgfältig ausgeführt, weil es einerseits die der Biuretbase entsprechende freie Säure ist und andererseits auch wie jene die Biuretreaktion gibt. Wegen der geringen Löslichkeit konnte nur eine 2 $\frac{1}{2}$ %ige Lösung verwendet werden. Wir haben drei Versuche ausgeführt mit einer Lösung von je 1 g Triglycylglycin in 40 ccm Wasser, die mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt war und bei 36° aufbewahrt wurde. Bei der ersten Probe wurde die Flüssigkeit nach 10 Tagen untersucht. Die beiden anderen blieben je 4 Wochen im Brutraum stehen. Nach dieser Zeit war die Biuretreaktion der Flüssigkeit nicht merklich vermindert, und es gelang auch nicht, nach dem oben angegebenen Verfahren in der Flüssigkeit Glycocoll nachzuweisen, denn es entstand bei der Veresterung nur eine äußerst geringe Menge einer Abscheidung, die nicht einmal eine Schmelzpunktbestimmung gestattete. Jedenfalls war der allergrößte Teil des Tetrapeptids unverändert.

Dileucyl-glycyl-glycin.<sup>2)</sup>

Wegen der geringen Löslichkeit mußten auf 1 g 75 ccm Wasser genommen werden. Die Lösung blieb mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft einen Monat im Brutraum. Sie war dann noch optisch völlig inaktiv, und aus der Flüssigkeit konnten 0,8125 g reines Tetrapeptid wiedergewonnen werden.

0,0994 g Substanz gaben 0,1950 g CO<sub>2</sub> u. 0,0758 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>:

53,63% C u. 8,38% H.

Gefunden:

53,5% C u. 8,4% H.

Glycocoll war in der Mutterlauge durch die Estermethode nicht nachzuweisen. Bei zweimaliger Wiederholung des Versuches unter den gleichen Bedingungen wurde niemals optische Aktivierung der Lösung beobachtet.

<sup>1)</sup> Ber. der Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2501, 1904.

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVII, S. 2506, 1904.

### Versuche mit Magensaft.

Wie bereits erwähnt, stammte der Saft aus einem kleinen Magen vom Hunde und war uns ebenfalls von Herrn Prof. Pawlow überlassen worden. Er war sehr wirksam. 1 g Casein wurde in 10 ccm des Saftes bei Brutttemperatur im Laufe von etwa 2 Stunden völlig gelöst, unter Bildung von Albumosen und Peptonen.

#### Glycyl-l-tyrosin.

1 g Dipeptid wurde in 10 ccm Magensaft gelöst und bei 36° aufbewahrt. Nach 14 Tagen wurde die klare Lösung im Vacuum bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Es ging alles in Lösung. Nun wurde nochmals zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit 3 ccm absolutem Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas zunächst unter Kühlung und schließlich unter kurzer Erwärmung eingeleitet. Auch nach Impfen mit einem Kriställchen von Glycocollesterchlorhydrat und nach längerem Stehen auf Eis erfolgte keine kristallinische Abscheidung. Glycocoll war also auch nicht in nachweisbarer Menge vorhanden.

Der Versuch wurde noch zweimal mit demselben Erfolge wiederholt.

#### Dialanyl-cystin.

1 g Dialanyl-cystin wurde in 10 ccm Magensaft gelöst und im Brutraum aufbewahrt. Nach 8 Tagen wurde die Lösung unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene verdampft, der Rückstand mit 3 ccm Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet, dann die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, die Ester mit Alkali und Kaliumkarbonat in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Der Äther wurde bei gewöhnlicher Temperatur unter vermindertem Druck destilliert, und das Destillat in einer sorgfältig gekühlten, verdünnte Salzsäure enthaltenden Vorlage

aufgefangen. Beim Verdampfen der Salzsäure verblieb fast kein Rückstand. Alanin war somit nicht entstanden.

#### Leucyl-leucin, Leucyl-alanin und Leucyl-glycin.

Je 0,5 g in 10 ccm Magensaft gelöst blieb 14 Tage im Brutraum. In allen drei Fällen konnte das unveränderte Dipeptid wiedergewonnen werden. Beim Leucyl-glycin schlug auch der Versuch, in der gewohnten Weise Glycocoll als Esterchlorhydrat nachzuweisen, fehl.

Man könnte gegen die Versuche mit Magensaft den Einwand erheben, daß die Menge der Salzsäure, die nur 0,4% des Saftes betrug, für die Bindung des Dipeptides und noch mehr für die Bindung der Spaltprodukte unzureichend war. Andererseits aber ist zu beachten, daß die Reaktion der Lösung dauernd ziemlich stark sauer war, und man hätte darum erwarten müssen, daß wenigstens eine teilweise Hydrolyse der Produkte stattfinden würde. Immerhin werden wir später die Versuche unter Zusatz von wechselnden Mengen Salzsäure wiederholen und auch andere peptische Fermente, wie Papayotin, in den Kreis der Untersuchung ziehen.