

Über synthetisch gewonnenes Tryptophan und einige seiner Derivate.

Von

Alexander Ellinger und Claude Flamand.

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Januar 1908.)

In den Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft¹⁾ haben wir bereits eine kurze Mitteilung über die von uns verwirklichte Synthese des Tryptophans veröffentlicht. Im folgenden berichten wir über die Einzelheiten unsrer Versuche und über einige bisher nicht dargestellte Derivate des Tryptophans, welche wir zur Identifizierung des synthetisch erhaltenen Produkts mit den bei der Pankreasverdauung des Caseins gewonnenen benutzt haben.

Vor der Beschreibung unserer Versuche sei uns ein kurzer Rückblick auf die Entwicklung, welche die Arbeiten zur Erforschung der Konstitution des Tryptophans durchgemacht haben, gestattet, da sie bisher nur in Bruchstücken und nicht in dieser Zeitschrift veröffentlicht wurden.

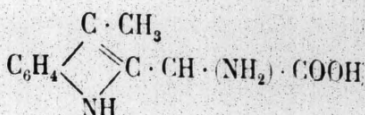
Die Konstitution des Tryptophans.

Hopkins und Cole²⁾ isolierten im Jahre 1901 unter den Produkten der Pankreasverdauung eine schön krystallisierende Verbindung von der Zusammensetzung $C_{11}H_{12}N_2O_2$, welche sie als das lange gesuchte Tryptophan ansprechen durften, da es in exquisitiver Weise die bekannte Farbenreaktion mit Bromwasser gab. Die reichliche Entwicklung von Indol und Skatol beim trockenen Erhitzen der Substanz führte die Autoren

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XL, S. 3029 (1907).

²⁾ Journ. of Physiol., Bd. XXVII, S. 418 (1901).

sofort zu der Vermutung, daß es sich um eine Indolaminopropionsäure oder Skatolaminoessigsäure handle. Bei ihren Versuchen zur Ermittlung der Konstitution des Tryptophans folgten Hopkins und Cole¹⁾ einem Gedankengang Nenckis.²⁾ Dieser hatte gelegentlich seiner Studien über Eiweißfäulnis die Vermutung ausgesprochen, daß die vier der Indolgruppe zugehörigen Fäulnisprodukte der Eiweißkörper, Indol, Skatol, Skatolcarbonsäure und Skatolelessigsäure, dem gleichen Bestandteil der Eiweißmolekel, einer bis dahin nicht aufgefundenen Skatolaminoessigsäure entstammten. Es gelang in der Tat, aus Tryptophan durch anaerobe Fäulnis Skatolelessigsäure, durch aerobe Fäulnis Skatolcarbonsäure und Indol und durch Kalischmelze Skatol in beträchtlichen Mengen zu gewinnen. Hopkins und Cole trugen deshalb kein Bedenken, das Tryptophan als Skatolaminoessigsäure zu bezeichnen und ihm die Formel



beizulegen.

Unabhängig von dieser Untersuchung stellten Ellinger und Gentzen³⁾ im Tierversuche fest, daß im Dickdarm des Kaninchens Tryptophan in großen Mengen Indol lieferte, daß dabei gleichzeitig Skatol in nachweisbarer Menge nicht entstand und daß die Bildung des Indols aus intermediär auftretendem Skatol unwahrscheinlich war. Es wurde deshalb schon in der Dissertation von Gentzen⁴⁾ darauf hingewiesen, daß von den ursprünglich zur Wahl gestellten Formeln des Tryptophans die der Indolaminopropionsäure die wahrscheinlichere sei, zumal da eine der Grundlagen für die Konstitutionsbestimmung des Tryptophans, die Formel der Skatolcarbonsäure, unsicher war.⁵⁾

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. XXIX, S. 451 (1903).

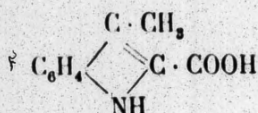
²⁾ Monatsh. f. Chemie, Bd. X, S. 506 (1889).

³⁾ Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys., Bd. IV, S. 171 (1903).

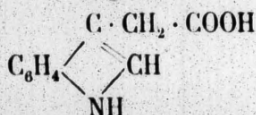
⁴⁾ M. Gentzen, Über die Vorstufen des Indols bei der Eiweißfäulnis im Tierkörper. Inaug.-Diss., Königsberg 1904.

⁵⁾ s. Wislicenus und Arnold, Annal. d. Chem., Bd. CCXLVI, S. 334 (1886).

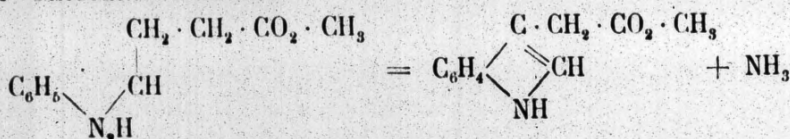
Ellinger¹⁾ gelang denn im Jahre 1904 der Nachweis, daß die von E. und H. Salkowski²⁾ entdeckte Fäulnissäure nicht die allgemein angenommene Konstitution einer Skatolcarbonsäure,



sondern einer Indol-Pr-3-Essigsäure



habt. Denn die Darstellung ihres Esters gelang nach dem Prinzip der Fischerschen Synthese von Indolderivaten aus dem Phenylhydrazon des Aldehydpropionsäuremethylesters mittels der Chlorzinkschmelze:



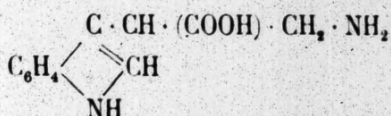
Durch Anwendung von alkoholischer Schwefelsäure als Kondensationsmittel nach dem Vorgange von W. Wislicenus ließ sich weiterhin die Ausbeute noch besser gestalten und in späteren Versuchen ergab sich, daß es nicht nötig ist, das Phenylhydrazon des Aldehydpropionsäuremethylesters darzustellen, sondern daß man auch vom Phenylhydrazid des Aldehydpropionsäurephenylhydrazons ausgehen kann. Da diese Verbindung nach den Untersuchungen von Reitter und Bender³⁾ noch leichter als früher zugänglich geworden ist, so ist die Indolessigsäure jetzt relativ bequem synthetisch zu gewinnen.

Mit der alten Formel der Skatolcarbonsäure mußte natürlich auch die bisher angenommene Tryptophanformel aufgegeben werden. Von den vier möglichen Konstitutionformeln, in welchen die Stellung Pr-2- oder α -Stellung im Pyrrolring keinen Substituenten trägt, glaubte Ellinger anfangs die folgende bevorzugen zu sollen:

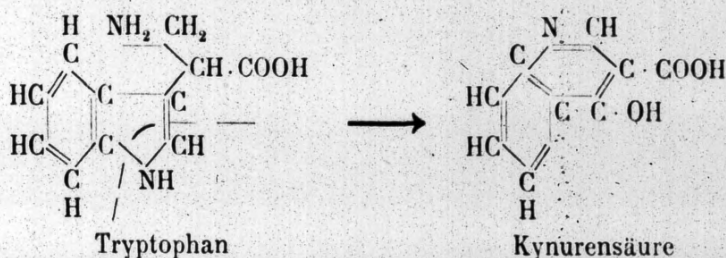
¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1801 (1904).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIII, S. 189 u. 2217 (1880).

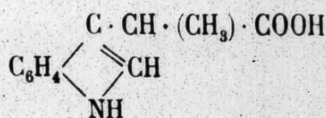
³⁾ Liebigs Annal., Bd. CCCXXXIX, S. 373 (1905).



Denn bei dieser Konstitution des Tryptophans schien dessen Übergang in Kynurensäure, der gleichzeitig von Ellinger gefunden wurde, einer einfachen, wenn auch ohne Analogie dastehenden Erklärung zugänglich:



Die zunächst vielleicht näher liegende Erklärung, daß das Chinolinderivat Kynurensäure aus dem Indolderivat Tryptophan sich, nach Analogie der von Ciamician¹⁾ und seiner Schule beobachteten Übergänge, unter Erweiterung des Fünfrings zum Sechsring bildete, wurde damals nicht diskutiert, weil schon einige Jahre vorher im hiesigen Institut festgestellt war, daß aus der Indolessigsäure der tierische Organismus keine Kynurensäure bildet, daß in diesem Falle also die Ringerweiterung nicht stattfindet. Dennoch erwies sich, wie uns die weiteren Untersuchungen über die Konstitution des Tryptophans zeigten, die erste Annahme als falsch. Kam dem Tryptophan wirklich die oben aufgezeichnete Formel zu, so mußte die Nenckische «Skatolessigsäure» die folgende Konstitution haben:

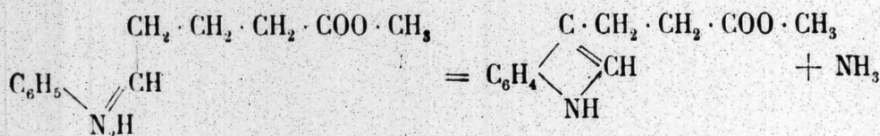


Ellinger²⁾ stellte auf analogem Wege wie die Indolessigsäure auch diese Indolmethyllessigsäure synthetisch dar. Sie war von der durch Fäulnis entstandenen Säure Nenckis verschieden. Dagegen lieferte die Kondensation des Phenylhydrazons der Aldehydbuttersäure mit alkoholischer Schwefel-

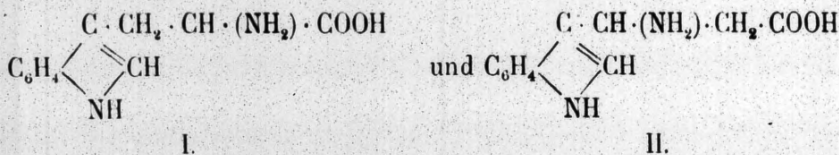
¹⁾ s. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 4231 (1904).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 2884 (1905).

säure die mit der Nenckischen Verbindung identische Indol-Pr-3-Propionsäure:

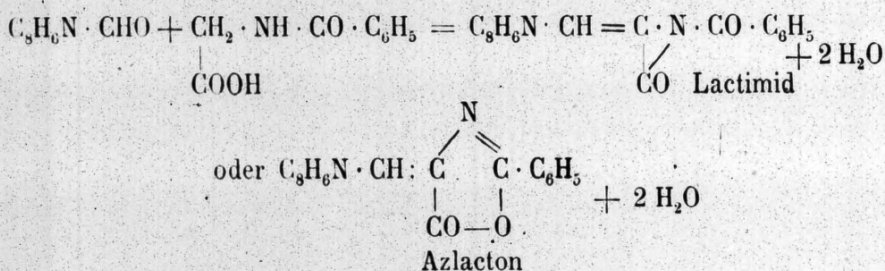


Somit blieben für das Tryptophan nur noch zwei Konstitutionsmöglichkeiten übrig:



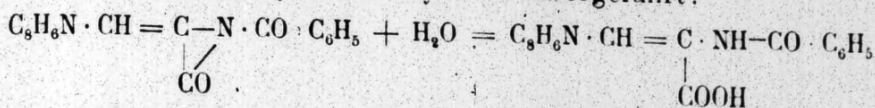
Die Analogie mit den anderen Bausteinen der Eiweißmolekel, unter welchen bisher mit Sicherheit nur α -Aminosäuren nachgewiesen worden sind, sprach für die Formel I. Den Beweis für ihre Richtigkeit haben wir durch die folgenden synthetischen Versuche erbracht.

Als Ausgangsmaterial diente der β -Indolaldehyd. Diese schön krystallisierende Verbindung wurde bereits von Hopkins und Cole bei der Oxydation des Tryptophans mit Eisenchlorid erhalten, aber in ihrer Konstitution erst von Ellinger erkannt. Er läßt sich, wie ebenfalls Ellinger zeigte, auch nach der Tiemann-Reimerschen Reaktion aus Indol durch Einwirkung von Chloroform und Kalilauge erhalten. Dieser Aldehyd läßt sich durch Erhitzen mit Hippursäure, Essigsäureanhydrid und Natriumacetat nach der Methode von Erlenmeyer jun.¹⁾ zu einem Lactimid oder (nach der von Erlenmeyer neuerdings bevorzugten Nomenklatur) Azlacton kondensieren:



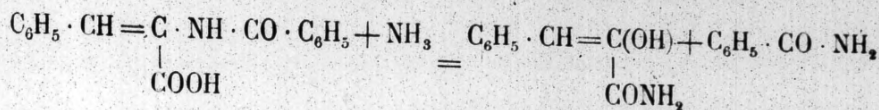
¹⁾ Ann. d. Chem., Bd. CCLXXV, S. 3 (1893); Bd. CCCVII, S. 138 (1899); Bd. CCCXXXVII, S. 265 ff. (1904).

Das Lactimid (Azlacton) wird durch Erhitzen mit verdünnter Natronlauge unter Wasseraufnahme in das Natriumsalz der Indolyl- α -benzoylaminoacrylsäure übergeführt:

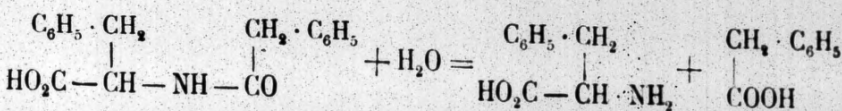
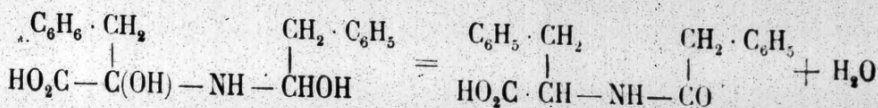
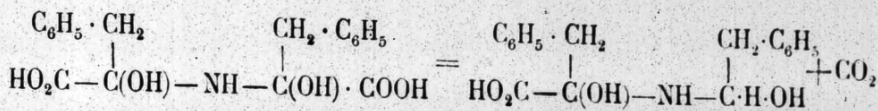
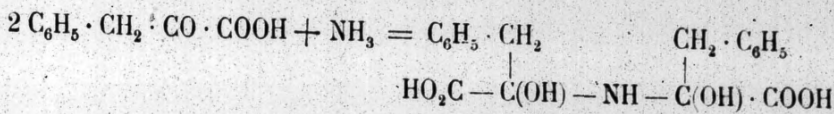
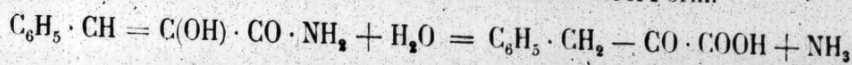


Bei seiner Synthese des Phenylalanins hat Erlenmeyer zwei Wege angegeben, um von der benzylierten ungesättigten Aminosäure zum Phenylalanin zu gelangen. Die erste Methode, die später durch E. Fischer und Mouneyrat¹⁾ vervollkommen wurde, besteht in der Reduktion mit Natriumamalgam und nachheriger Abspaltung der Benzoylgruppe durch Kochen mit Salzsäure. Für die Tryptophansynthese führte uns dieser Weg nicht zum Ziele.

Die zweite Methode benutzt die Einwirkung des Ammoniaks auf die Benzoylaminozimmtsäure. Durch die eingehenden Studien Erlenmeyers ist diese Reaktion in allen ihren Zwischenstadien aufs sorgfältigste erforscht und wird durch die folgenden Umsetzungsgleichungen veranschaulicht:



Phenylbrenztraubensäure- amid in tautomerer Form. Benzamid



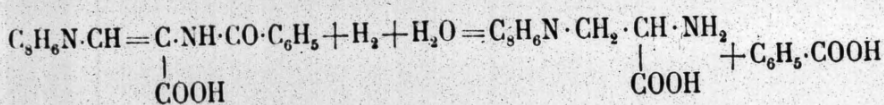
¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 283 (1900).

Als Endprodukte der Einwirkung des Ammoniaks auf Benzoylaminozimmtsäure wurden also Benzamid, Kohlensäure, Phenylalanin und Phenylelessigsäure erhalten. Analog mußte aus der Indolyl-benzoylaminoacrylsäure neben den beiden ersten Produkten Indolalanin und Indolessigsäure entstehen.

In der Tat konnten nach sechsständigem Erhitzen von kleinen Mengen der ungesättigten Aminosäure (etwa 0,5 g) mit der 10 fachen Menge 25%igen Ammoniaks auf 160—170° im Rohr, im Rohrinhalt die sämtlichen erwarteten Reaktionsprodukte qualitativ nachgewiesen werden. Das Benzamid war zum Teil zu Ammoniumbenzoat hydrolysiert. Aus der angesäuerten Flüssigkeit ging eine Säure in Äther, welche alle Farbenreaktionen der Indolessigsäure gab, und durch Fällung mit Mercurisulfat entstand nach der Ausschüttelung ein gelber Niederschlag, der nach der Zersetzung mit Schwefelwasserstoff und weiteren Reinigung in der üblichen Weise sowohl die Glyoxylsäure- als die Bromreaktion des Tryptophans mit vollkommen reinen Farbnuancen gab. Die Ausbeuten waren aber so gering, daß die Vorversuche nicht zur Verarbeitung größerer Substanzmengen auf diesem Wege ermutigten. Immerhin zeigen diese orientierenden Versuche, wenn man ihre Resultate mit den späteren zusammenhält, daß das Erlenmeyersche Schema auch auf die Entstehung des Indolalanins anwendbar ist, wenn auch die Identität der so entstandenen Aminosäure mit dem Tryptophan dadurch nicht bewiesen war.

Nach mancherlei vergeblichen Bemühungen fanden wir endlich in der Einwirkung von metallischem Natrium in alkoholischer Lösung ein geeignetes Reduktionsmittel für die Indolyl-benzoylaminoacrylsäure, welches den Vorteil bot, zugleich die Abspaltung der Benzoylgruppe zu bewirken. So konnte das Kochen mit Säuren zu diesem Zwecke vermieden werden, das voraussichtlich zu einem beträchtlichen Verlust an Tryptophan geführt hätte.

Bei Anwendung des Natriums vollzog sich also die Bildung des Indol-Pr 3-alanins nach der Gleichung



Daß das Indol-Pr 3-alanin mit dem racemischen Tryptophan identisch ist, beweisen die folgenden Angaben über sein physikalisches und chemisches Verhalten, sowie das seiner Derivate.

Darstellung des Indolaldehyds.

Die Verarbeitung des Indols auf den Aldehyd geschieht in Portionen von nicht über 20 g. Diese werden in 200 ccm 96%igem Alkohol gelöst und mit 72 ccm Chloroform am Rückflußkühler bis zum beginnenden Sieden auf dem Wasserbad erhitzt. Durch einen Tropftrichter gibt man im Laufe von 2 bis 2½ Stunden 500 ccm 10%ige alkoholische Kalilauge zu, welche durch Lösen von 50 g Ätzkali in der gleichen Menge Wasser und Auffüllen mit 96%igem Alkohol auf ein ½ l hergestellt sind. Es ist für die Ausbeute wichtig, daß der Zufluß der Kalilauge gleichmäßig erfolgt und daß das Trichterrohr sich nicht durch auskrystallisierendes Chlorkalium verstopft. Deshalb empfiehlt es sich, das Rohr des Tropftrichters genügend weit zu nehmen. Die Lösung färbt sich schon im Beginn der Operation gleichzeitig mit der Ausscheidung von Chlorkalium rötlich. Nach beendigtem Zusatz der Kalilauge wird noch eine halbe Stunde stark gekocht. Vom Reaktionsprodukt wird der Alkohol und unverändertes Chloroform aus dem Wasserbade abdestilliert. Der neutral reagierende Rückstand wird mit heißem Wasser aufgenommen und im Dampfstrom destilliert, bis in der Lösung höchstens noch Spuren von Indol mit Hilfe der in der Kälte angestellten Nitrosoindolreaktion nachweisbar sind. Die Dampfdestillation muß in einem Zuge zu Ende geführt werden. Falls das Wasser im Kessel erneuert werden muß, ist darauf zu achten, daß die Lösung im Destillationskolben nicht erkaltet. Sonst schließt das Harz, das sich während des Übertreibens abscheidet, beträchtliche Mengen des Aldehyds ein, welche nachträglich schwer zu entfernen sind, und die Ausbeute wird vermindert. Die gegen Ende der Destillation vollkommen sich klärende Lösung wird sofort heiß durch einen Heißwassertrichter filtriert. Aus dem Filtrate scheiden sich beim Erkalten schwach gelb gefärbte, fast reine lange Nadeln des β -Indolaldehyds ab, welche ohne weitere Reinigung zur Kondensation mit Hippursäure verarbeitet werden können.

Im Destillat wird in der in den Berichten der chemischen Gesellschaft beschriebenen Weise das unveränderte Indol vom Chlorchinolin getrennt und von neuem auf Aldehyd verarbeitet. Nach zweimaliger Wiederholung der Operation empfiehlt es sich, das durch Ausschütteln mit Äther erhaltene Indol vor dem erneuten Verarbeiten mittels Destillation im Dampfstrom zu reinigen, damit der Indolaldehyd in genügender Reinheit auskrySTALLISIERT. Das oben erwähnte Harz muß wiederholt mit Wasser ausgekocht werden und liefert so noch ansehnliche Mengen des Aldehyds.

Bei Beachtung der angegebenen Vorschriften wurden aus 100 g Indol etwa 28 g Indolaldehyd neben mehr als 35 g Chlorchinolin erhalten.

Kondensation von Indolaldehyd mit Hippursäure zum Azlaktone.

6 g Indolaldehyd, 8,5 g Hippursäure und 3,3 g frisch geschmolzenes Natriumacetat werden gut mit einander verrieben, mit 15 ccm Essigsäureanhydrid übergossen und 15 Minuten lang im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach wenigen Minuten beginnt eine intensive dunkel-rotgelbe Färbung, die Masse schmilzt zusammen und erstarrt nach dem Erkalten zu einem festen, etwas harzigen Kuchen, der sich unschwer aus dem Kolben entfernen läßt. Der Kuchen wird zunächst mit lauwarmem Wasser wiederholt ausgezogen, dann mit etwa 1—2 l Wasser ausgekocht, in der Reibschale verrieben, nochmals ausgekocht und filtriert. Das abgesaugte Rohprodukt wog lufttrocken etwa 8—10 g.

Aus den Waschwässern lassen sich etwa 1—1,5 g unveränderter Indolaldehyd rein gewinnen. Ein Teil scheidet sich aus dem zum Auskochen benutzten Wasser beim Erkalten aus, beim Einengen dieser Lösung erhält man eine zweite Krystallisation, eine dritte Fraktion läßt sich aus der mit Soda alkalisch gemachten essigsäuren Lösung durch Äther ausschütteln. Säuert man die ausgeschüttelte Lösung mit Schwefelsäure an, so scheiden sich noch etwa 2 g Hippursäure aus. Aus diesen Zahlenangaben ergibt sich, daß zwar ein Teil der angewandten

Substanzen nicht in Reaktion tritt, daß aber Nebenreaktionen nicht in Betracht kommen.

Das rohe Azlacton wird gepulvert, im Vakuumexsikkator vollkommen getrocknet und am besten aus heißem Chloroform umkrystallisiert. Die erste Abscheidung liefert etwa die Hälfte des Rohprodukts in prachtvoll glänzenden, dunkelorange-farbigem Prismen, welche bei 202° zu sintern beginnen und bei 220° vollständig schmelzen. Die Verbindung krystallisiert mit einem Molekül Chloroform, das beim Erhitzen auf 100° entweicht. Aus der Mutterlauge läßt sich durch Einengen nur wenig weitere Substanz gewinnen. Durch allmählichen Zusatz von absolutem Alkohol zur konzentrierten Chloroformlösung scheidet sich beim Verdunsten noch reichlich Azlacton aus.

0,1881 g lufttrockene Substanz: 0,3866 g CO_2 und 0,0577 g H_2O .

0,2908 g Substanz verloren beim Trocknen bei 98° : 0,0832 g Chloroform und lieferten 17,8 ccm N bei 18° und 752 mm Druck.

0,1854 g bei 100° getrocknete Substanz lieferten 15,6 ccm N bei 20° und 760 mm Druck.

$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{CHCl}_3$. Ber.: CHCl_3 29,29; C 55,95; H 3,22; N 6,88
(Mol.-Gew. 407,6). Gef.: > 28,61; > 56,05; > 3,42; > 6,82

$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (Mol.-Gew. 288,2). Ber.: N 9,74; Gef.: N 9,63.

Aufspaltung des Azlactons zur ungesättigten Säure: Indolyl- α -benzoylaminoacrylsäure.

Das Azlacton wird mit der 100fachen Menge 1%iger Natronlauge auf freier Flamme erhitzt, bis sich Ammoniakentwicklung bemerkbar macht. Der ungelöst gebliebene Rückstand wird abfiltriert und in der gleichen Weise behandelt, bis nahezu alles gelöst ist. Die vereinigten alkalischen Filtrate werden heiß mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure unter Umrühren versetzt, bis die Flüssigkeit auf Kongo reagiert. Die Säure fällt sofort in krystallinischen Drusen aus und wird nach eintägigem Stehen in der Kälte abfiltriert. Die in Wasser nahezu unlösliche Substanz wird aus etwa 70%igem Alkohol umkrystallisiert und scheidet sich in glänzend weißen Prismen mit aufgesetzten Pyramiden aus. Ihr Schmelzpunkt ist nicht ganz scharf. Sie färbt sich bei 228° gelb, schmilzt bei $232-234^{\circ}$ und zersetzt sich bei 235° unter Gasentwicklung.

0,1504 g im Vakuum getrocknete Substanz: 0,3878 g CO_2 und 0,0604 g H_2O .
 0,1831 g, ebenso getrocknet: 14,6 ccm N bei 20° und 757 mm Druck.

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$. Ber.: C 70,55; H 4,62; N 9,17
 (Mol.-Gew. 306,2). Gef.: > 70,32; > 4,47; > 9,09

Die Aufspaltung des Azlactons erfolgt nahezu quantitativ, wenn man analysenreines Material verwendet. Man kann aber auch das rohe Azlacton in die ungesättigte Säure überführen und diese erst durch Umkrystallisieren reinigen, ohne daß dadurch die schließliche Ausbeute verschlechtert wird. Durch kurzes Kochen mit Essigsäureanhydrid läßt sich die Säure in das Azlacton zurückverwandeln, eine Reaktion, die zum Nachweis der Säure in kleinen Mengen uns wiederholt im Laufe der Untersuchungen gute Dienste geleistet hat.

Äthylester der Indolyl-benzoylaminoacrylsäure.

In einem Versuche, in welchem das Azlacton nicht in der beschriebenen Weise durch Umkrystallisieren aus Chloroform, sondern aus verdünntem Alkohol gereinigt wurde, entstand auf folgende Weise als Nebenprodukt der Ester der Indolyl-benzoylaminoacrylsäure: Das rohe Azlacton wurde mit 60%igem Alkohol, der hierin unlösliche Anteil mit 90%igem Alkohol, das in Alkohol Unlösliche mit Aceton ausgekocht. Es hinterließ schließlich ein in Aceton schwer löslicher Rückstand, der mit Alkohol und Natronlauge gekocht, dann mit Wasser und Schwefelsäure gefällt wurde. Dabei schieden sich schöne, atlasglänzende Nadeln vom Schmelzpunkt 206° ab.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,1501 g im Vakuum getrocknete Substanz: 0,0711 g H_2O und 0,3947 g CO_2 .
 0,1691 g Substanz gaben 12,8 ccm N bei 17° und 752 mm Druck.

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$. Ber.: C 71,81; H 5,44; N 8,38
 (Mol.-Gew. 334,2). Gef.: > 71,72; > 5,28; > 8,69

Daß es sich bei diesem zufällig aufgefundenen Nebenprodukt wirklich um den Ester der ungesättigten Säure handelt, der wohl erst durch Einwirkung des Alkohols auf kleine Mengen bei der Kondensation entstandene Säure gebildet und nicht leicht verseift wurde, geht aus folgenden Reaktionen hervor.

Kocht man die Verbindung mit starker Kalilauge am Rückflußkühler, so wird sie gelöst, wobei etwas Ammoniak ent-

weicht infolge Zersetzung der Indolyl-benzoylaminoacrylsäure. Beim Abdestillieren geht Alkohol über, der mit der Jodoformprobe, der Aldehydprobe und durch das Auftreten des Geruchs nach Benzoessäureester beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge nachgewiesen wurde. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fällt die Indolyl-benzoylaminoacrylsäure aus; sie wurde durch den Schmelzpunkt und die Überführung in das Azlacton mittels Essigsäureanhydrid identifiziert.

Reduktion und Spaltung der Indolyl-benzoylaminoacrylsäure.

3,8 g bei 100° getrocknete Säure wurden in 120 ccm absolutem Alkohol auf dem Wasserbad am Rückflußkühler gelöst. In die siedende Lösung wurden im Laufe einer halben Stunde 12,5 g metallisches Natrium in kleinen Scheiben eingetragen. Zum Schluß wurden weitere 20 ccm absoluten Alkohols zugegeben und die Flüssigkeit 20 Minuten im Sieden gehalten. Darauf wurde nach Zusatz von 15 ccm Wasser nochmals 45 Minuten gekocht. Die alkalische Lösung wurde in die fünffache Menge Wasser gegossen und 3 bis 4 mal mit Äther ausgeschüttelt. Der ölige Ätherrückstand wog trocken etwa 0,2 g und zeigte einen charakteristischen Geranium-Geruch. Er wurde nicht weiter verarbeitet.

Die alkalische, vom Äther abgetrennte Lösung wurde mit Schwefelsäure bis zur Reaktion auf Kongopapier angesäuert und nach eintägigem Stehen im Eisschrank von einem beträchtlichen Niederschlag abfiltriert. Das Gewicht der Abscheidung betrug trocken 1,05 g (R_1). Sie besteht zum großen Teil aus unverändertem Ausgangsmaterial, wie ihr Verhalten gegen Essigsäureanhydrid beweist.

0,5 g wurden mit 1,5 ccm Essigsäureanhydrid einige Minuten gekocht, wobei intensive rotbraune Färbung auftritt. Die Lösung wurde durch viel Wasser gefällt, der Niederschlag mit kalter 1%iger Natronlauge verrührt und nach mehrstündigem Stehen abfiltriert. Er ließ sich nach dem Trocknen im Vakuum aus Chloroform umkrystallisieren und zeigte den Schmelzpunkt des Azlactons. Die von dem rohen Azlacton abfiltrierte alkalische

Lösung gibt mit Schwefelsäure einen Niederschlag, der zwar nicht analysenrein gewonnen wurde, der aber, wie aus folgenden Reaktionen hervorgeht, Benzoyltryptophan enthält. Kochte man 0,3 g mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure ($D = 1,19$) 12 Stunden lang am Rückflußkühler, so schied sich zunächst viel Harz ab, das abfiltriert wurde. Durch Ausschütteln mit Äther ließen sich einige Zentigramme einer Säure gewinnen, die, zunächst aus Petroläther, dann aus Wasser umkrystallisiert, den Schmelzpunkt und unter dem Mikroskop das Aussehen der Benzoesäure hatten. Die ausgeschüttelte salzsaure Lösung wurde mit Tierkohle gekocht. Dabei blieb alle organische Substanz in der Tierkohle. Aus dieser konnte aber durch wiederholtes Auskochen mit 70%igem Alkohol eine wenig gefärbte Lösung erhalten werden, die in ausgezeichneter Weise die Glyoxylsäure- und die Bromreaktion des Tryptophans gab.

Das Filtrat von der Säurefällung (R_1) wurde 4 bis 5 mal mit Äther ausgeschüttelt, bis der Äther sich nicht mehr färbte. Das Ätherextrakt wog trocken 0,58 g und erwies sich, in der gleichen Weise wie die Fällung R_1 geprüft, in der Hauptsache als ein Gemenge von wenig Indolyl-benzoylaminoacrylsäure und viel Benzoyltryptophan.

Die mit Äther erschöpfte Lösung wurde endlich noch dreimal mit Essigäther geschüttelt, dabei gingen noch 0,17 g Substanz in Lösung, die nicht weiter untersucht wurden. Nachdem die Lösung auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht war, wurde sie mit Mercurisulfat gefällt und nach dem von Neuberg und Popowsky¹⁾ modifizierten Hopkins'schen Verfahren auf Tryptophan verarbeitet. Das Tryptophan schied sich zunächst mit Natriumsulfat verunreinigt ab. Durch dreimaliges Umkrystallisieren aus 50%igem Alkohol mit Zusatz von wenig Tierkohle gelang es aber schließlich ein analysenreines Präparat zu erhalten, in welchem keine Spur Sulfat mehr nachweisbar war. Die Ausbeute betrug ca. 15% der Theorie.

In seinem Aussehen unterscheidet sich das synthetische Tryptophan nicht von dem durch Verdauung erhaltenen. Es bildet seidenglänzende rhombische oder sechsseitige Plättchen.

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. II, S. 357 (1907).

Es ist, wie zu erwarten war, optisch-inaktiv und zeigt einen schwach süßlichen Geschmack, ebenso wie E. Fischer und Warburg¹⁾ das racemische Leucin im Gegensatz zum natürlichen l-Leucin süß schmeckend fanden.

0,1276 g Substanz, im Vakuum getrocknet, gaben 0,3011 g CO₂
und 0,0706 g H₂O.

0,1304 g Substanz gaben 15,4 ccm N bei 22° und 764 mm Druck.

C₁₁H₁₂N₂O₂. Ber.: C 64,64; H 5,92; N 13,75

(Mol.-Gew. 204,2). Gef.: > 64,36; > 6,19; > 13,45

Der Schmelzpunkt des racemischen Tryptophans ist ebenso wie der des optisch-aktiven kein scharfer. Bei langsamem Erhitzen beginnt bei 240° eine Färbung, während sich in den oberen Teilen des Kapillarröhrchens ein braunes Destillationsprodukt niederschlägt. Bei 256° werden feine Tröpfchen sichtbar, bei 264° ist die Substanz völlig geschmolzen. Bei 266° tritt Zersetzung unter Gasentwicklung ein. Wir fanden für ein mehrfach umkrystallisiertes Verdauungstryptophan, welches, in Normalnatronlauge gelöst, die spezifische Drehung + 5,27° zeigte, welches also, falls man die von Abderhalden und Kempe²⁾ bestimmte spezifische Drehung + 6,12° als die richtige ansieht, in geringem Grade racemisiert war, den Schmelzpunkt genau ebenso wie für das synthetische Produkt.

Die Angaben über den Schmelzpunkt des Verdauungstryptophans in der Literatur schwanken innerhalb merkwürdig weiter Grenzen. Die Entdecker Hopkins und Cole geben 252° an, Neuberg und Popowsky 273°, Abderhalden und Kempe 289° (korr.). Diese Differenzen vollkommen aufzuklären, sind wir nicht imstande. Allers³⁾ hat neuerdings bei der Verdauung ein inaktives, süß schmeckendes Tryptophan erhalten, für welches er den Schmelzpunkt zwischen 256 und 268° fand, und ein von Neuberg⁴⁾ dargestelltes, durch Erhitzen mit Salzsäure racemisiertes Produkt schmolz bei 254—255°. Es mag also sein, daß der Schmelzpunkt von der stereochemischen Konfiguration eine gewisse Abhängigkeit zeigt. Daß aber die Art

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 4005 (1906).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 207 (1907).

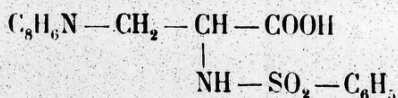
³⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. VI, S. 272 (1907).

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. VI, S. 276 (1907).

des Erhitzens von größtem Einflusse ist, geht daraus hervor, daß Herr Abderhalden, dem wir eine Probe unseres Präparats übersandten, den Schmelzpunkt bei raschem Erhitzen ca. 12° höher fand, als wir bei langsamerem. Bei raschem Erhitzen konnten wir seine Angabe bestätigen.

Zur Identifizierung des synthetischen Produkts mit dem Verdauungstryptophan stellten wir weiterhin eine Reihe von Derivaten dar. Zumeist mußten wir uns freilich wegen Mangels an Material damit begnügen, die Übereinstimmung des Aussehens unter dem Mikroskop und des Schmelzpunktes zu konstatieren. Nur von dem Benzolsulfoderivat konnten wir auch wenigstens eine Stickstoffbestimmung ausführen.

Benzolsulfo-d-Tryptophan



0,5 g d-Tryptophan wurden in Normalnatronlauge gelöst und unter abwechselndem Zusatz von Benzolsulfochlorid und Natronlauge geschüttelt bis zum Verschwinden des Geruchs nach Benzolsulfochlorid. Im ganzen wurden im Laufe von $\frac{3}{4}$ Stunden 35 ccm Normalnatronlauge und 2,5 ccm Benzolsulfochlorid zugesetzt. Die alkalische Lösung wurde von einem unbedeutenden Niederschlag abfiltriert und mit Eisessig gefällt. Die abgeschiedene Säure krystallisierte nach mehrstündigem Stehen in der Kälte in derben Nadeln. Durch Abfiltrieren erhielten wir 0,61 g krystallinisches Rohprodukt, weitere 0,2 g konnten der Mutterlauge noch durch Ausschütteln mit Äther, der zur Entfernung der Essigsäure mit Wasser gewaschen werden muß, entzogen werden. Die Reinigung gelang am besten auf folgendem Wege: Das etwas gefärbte Rohprodukt wurde in heißem Alkohol gelöst, mit wenig Tierkohle gekocht und durch einen Heißwassertrichter filtriert. Zu der warmen, farblosen, alkoholischen Lösung wurde Wasser bis zum Auftreten einer bleibenden Trübung gesetzt. Durch Aufkochen wurde die Ausscheidung wieder gelöst; beim Stehen in der Kälte schieden sich die Krystalle farblos ab. Das zweimal in der beschrie-

benen Weise umkrystallisierte Produkt schmolz unter Zersetzung bei 185° ,

0,2034 g, im Vakuum getrocknet, gaben 0,4397 g CO_2 und 0,0905 g H_2O .

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$. Ber.: C 59,27; H 4,70
(Mol.-Gew. 344,2). Gef.: > 58,93; > 4,98

Die Verbindung bildet ein ziemlich schwer lösliches Natriumsalz.

Benzolsulfo-r-Tryptophan.

Die aus dem synthetischen Produkt in gleicher Weise hergestellte Benzolsulfoverbindung hatte genau den gleichen Schmelzpunkt. Die Stickstoffbestimmung wurde nach Kjeldahl ausgeführt.

0,110 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 6,2 ccm $\text{n}/_{10}$ -Schwefelsäure.

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$. Ber.: N 8,16
Gef.: > 7,89

Zur Erkennung sehr kleiner Mengen Tryptophan dürfte sich diese Verbindung wie kaum eine andere eignen. Etwa 3 cg ließen sich als Benzolsulfoverbindung noch isolieren, umkrystallisieren und durch den Schmelzpunkt identifizieren.

β -Naphtalinsulfo-d-Tryptophan.

Abderhalden und Kempe haben bereits die Einwirkung von Naphtalinsulfochlorid auf Tryptophan untersucht und beobachtet, daß sich, wenn man eine ziemlich konzentrierte Lösung von Tryptophan in Natronlauge mit der ätherischen Lösung des Sulfochlorids nach der Vorschrift von E. Fischer und Bergell¹⁾ schüttelt, sich schon während des Schüttelns ein krystallinischer Niederschlag von Naphtalinsulfo-Tryptophannatrium bildet. Wir hatten gleichzeitig mit den genannten Autoren die gleiche Beobachtung gemacht und können ihre Angaben nach jeder Richtung bestätigen. Das Natriumsalz ist zweifellos bequemer rein zu erhalten als die freie Säure. Wenn es sich aber darum handelt, sehr kleine Mengen Tryptophan nachzuweisen, dürfte es sich gleichwohl mehr empfehlen, die freie Säure darzustellen, weil man aus dem Reaktionsprodukt diese nach dem Ansäuern durch Äther vollständig gewinnen kann, wenn das Natriumsalz noch gelöst bleibt.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3779 (1902).

Die Reinigung der Säure erfolgte ebenso wie bei der Benzolsulföverbindung, nur daß zum Ansäuern Schwefelsäure benutzt wurde. Etwa abgeschiedenes Natriumsalz wurde in viel Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit Äther ausgeschüttelt. Die Säure schmilzt bei 180°.

0,188 g im Vakuum getrocknete Substanz gaben 0,4415 g CO₂
und 0,0875 g H₂O.

0,152 g Substanz verbrauchten, nach Kjeldahl bestimmt,
7,55 ccm n/10-Schwefelsäure.

C₂₁H₁₈N₄O₄S. Ber.: C 63,95; H 4,61; N 7,11
(Mol.-Gew. 394,2). Gef.: > 64,04; > 5,18; > 6,95

Vom r-Tryptophan wurden einige Zentigramme in der gleichen Weise mit Naphthalinsulfochlorid behandelt. Das Produkt zeigte das gleiche Aussehen und den gleichen Schmelzpunkt.

Naphtylisocyanat-d-Tryptophan.

0,5 g d-Tryptophan wurden in 30 ccm n/10-Natronlauge gelöst und mit 0,6 g Naphtylisocyanat geschüttelt. Nach ³/₄ Stunden wurde filtriert, wobei etwa 0,25 g Naphtylharnstoff zurückblieben. Auf Ansäuern mit Schwefelsäure fällt das Produkt gelatinös aus. Es wurde abgesaugt, mit warmem Ammoniak aufgenommen und heiß mit Eisessig gefällt, wobei es sich in Nadelbüscheln abschied. Wir erhielten es analysenrein und in guter Ausbeute durch mehrmaliges Umfällen aus Aceton mit Wasser in der Kälte. Der Schmelzpunkt lag bei 158°, während Neuberg, der die Verbindung jüngst kurz beschrieben hat, 159—160° fand. Das Naphtylisocyanat-Tryptophan ist ebenso wie die Phenylisocyanat-Verbindung außerordentlich lichtempfindlich. Die Darstellung und Reinigung wurde deshalb nur bei schwachem Lampenlicht vorgenommen. Im Dunkelzimmer aufbewahrt, zeigte sie nach Monaten keine Veränderung des Schmelzpunktes.

0,1515 g im Vakuum getrocknete Substanz verbrauchten nach Kjeldahl
11,98 ccm n/10-Schwefelsäure.

C₂₂H₁₉N₃O₃. Ber.: N 11,27
(Mol.-Gew. 373,3). Gef.: > 11,07

Auch die Naphtylecyanatverbindung läßt sich zum Nachweis kleiner Tryptophanmengen verwerten. 3 cg synthetisches Tryptophan gaben die Verbindung vom gleichen Schmelzpunkt und Aussehen.