

# **Darstellung optisch aktiver Polypeptide aus Racemkörpern.**

Von

**Emil Abderhalden und Heinrich Geddert.**

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. August 1911.)

Bei der Darstellung optisch aktiver Polypeptide, sei es mit Hilfe von optisch aktiven Aminosäurechloriden, sei es unter Verwendung von optisch aktiven Halogenazylchloriden, ist die Möglichkeit einer teilweisen Racemisierung nicht ausgeschlossen. Im allgemeinen scheint allerdings bei vorsichtiger Verwendung der von Emil Fischer gegebenen Methoden die Gefahr der Bildung von Racemkörpern keine sehr erhebliche zu sein. Immerhin sind die für die einzelnen Polypeptide angegebenen Werte für das Drehungsvermögen nicht als absolute zu betrachten. Emil Fischer hat selbst darauf hingewiesen, daß eine Garantie für optisch ganz einheitliche Verbindungen nicht gegeben ist. Der eine von uns<sup>1)</sup> hat auf die Möglichkeit der Bildung von geringen Mengen Racemkörpern aus Anlaß der Mitteilung von Hans Fischer,<sup>2)</sup> wonach zerhackte Leber und Pankreatin d-Leucyl-l-tryptophan spalten sollen, hingewiesen. Die Feststellung von Hans Fischer nimmt gegenüber einer sehr großen Anzahl von Befunden, die zuerst Emil Fischer und Bergell und dann an einem besonders großen Material Emil Fischer und Emil Abderhalden und dann der letztere mit einer großen Anzahl von Mitarbeitern erhoben hat, eine Ausnahmestellung ein.

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Josef Schuler, Synthese von Polypeptiden: Derivate des Isoleucins, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Jg. 43, S. 907, 1910.

<sup>2)</sup> Hans Fischer, d-Leucyl-l-tryptophan, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Jg. 42, S. 4320, 1909.

Die verschiedenartigsten Verdauungssäfte — mit Ausnahme von Pepsinsalzsäure, die keines der bis jetzt dargestellten Polypeptide angegriffen hat — und ebenso die Preßsäfte aus den verschiedenartigsten Organen zerlegten stets nur solche Polypeptide, an deren Aufbau die in der Natur vorkommenden Aminosäuren beteiligt waren. Wurden Racemkörper verwendet, dann erfolgte asymmetrische Spaltung. Übrig blieb das Polypeptid, das aus optisch aktiven Aminosäuren aufgebaut war, die in der Natur nicht vorkommen. Bekanntlich ist auf Grund dieser Beobachtungen die Struktur bestimmter Racemkörper aufgeklärt worden. Verfüttert man racemische Polypeptide (Dipeptide), dann tritt im Harn meist der Anteil des Racemkörpers auf, der die in der Natur nicht vorkommenden Aminosäuren enthält. Es erscheint jedoch in keinem Falle die gesamte Menge des betreffenden Polypeptids im Harn. Der Organismus hat offenbar Bedingungen in seinen Zellen, die eine Lösung von Bindungen zwischen in der Natur nicht vorkommenden Aminosäuren ermöglichen. Es wird von Interesse sein, dieses Problem weiter zu verfolgen und festzustellen, wie sich der tierische und menschliche Organismus unter verschiedenen Bedingungen gegenüber verschiedenen Racemkörpern verhält. Die Formoltitration nach Sørensen und die Bestimmungen des Aminostickstoffs nach van Slyke gestatten jetzt eine viel schärfere Bestimmung der nach Verfütterung von Polypeptiden im Harn auftretenden Produkte.

Die Möglichkeit, daß Preßsäfte aus Zellen auch Polypeptide spalten, die unter ihren Bausteinen auch solche führen, die in der Natur nicht vorkommen, ist somit nach den Beobachtungen am lebenden Tier gegeben. Der eine von uns konnte selbst mit Pringsheim<sup>1)</sup> nachweisen, daß Preßsäfte, die von niederen Organismen stammen, «unnatürliche» Dipeptide spalten. Für höhere Organismen, selbst für Hefe, bleibt dagegen der von Hans Fischer mitgeteilte Fall eine Ausnahme. Nun hat H. Fischer die eingetretene Spaltung des von ihm verwandten

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Hans Pringsheim. Studien über die Spezifität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. I. Mittel. Diese Zeitschrift. Bd. 59. S. 249, 1909.

d-Leucyl-l-tryptophans aus dem Auftreten der Bromreaktion erschlossen. Er stützte sich bei diesem Vorgehen auf unsere gemeinsame mit Kempe gemachte Feststellung, wonach Polypeptide, welche Tryptophan als Baustein besitzen, mit Bromwasser keine Reaktion geben. Fällt diese positiv aus, dann ist das ein Beweis dafür, daß Tryptophan abgespalten worden ist. Der Befund von H. Fischer beweist einwandfrei, daß bei dem von ihm angestellten Versuche Tryptophan aus dem angewandten Dipeptid abgespalten worden ist. Dagegen fehlt der Nachweis, ein wie großer Teil des Dipeptids zerlegt wurde. Die Bromwasserreaktion ist außerordentlich empfindlich. Wir haben auf Grund unserer reichen Erfahrungen auf diesem Gebiet die Vermutung ausgesprochen, daß Hans Fischer nicht die Spaltung des d-Leucyl-l-tryptophans, sondern diejenige von l-Leucyl-l-tryptophan beobachtet hat. Die Deutung seines Befundes im Sinne von Hans Fischer wäre nur dann völlig einwandfrei, wenn der Beweis geführt wäre, daß das angewandte Dipeptid optisch vollständig einheitlich war. Es ist dies nicht sehr wahrscheinlich. Die Vermutung, daß sich bei der Synthese etwas Racemkörper gebildet hat — vorausgesetzt, daß die angewandten Komponenten absolut optisch rein waren —, ist nicht von der Hand zu weisen. Das von Hans Fischer angewandte Material hat nach unserer Meinung, die speziell auf den von Emil Fischer und uns gemachten Beobachtungen sich gründet, folgende Zusammensetzung gehabt. Der bei weitem größte Teil des Dipeptids bestand aus optisch reinem d-Leucyl-l-tryptophan, daneben fand sich l-Leucyl-l-tryptophan.<sup>1)</sup> Von diesem letzteren wäre nach unserer Auffassung das l-Leucyl-l-tryptophan gespalten worden. Übrig geblieben wäre das gesamte d-Leucyl-l-tryptophan. Hans Fischer ist dieser Auffassung nicht beigetreten.<sup>2)</sup> Er hält an seinem Standpunkt fest, wonach Hefe und Leberpreßsaft d-Leucyl-l-tryptophan

<sup>1)</sup> Vielleicht auch noch l-Leucyl-d-tryptophan und d-Leucyl-d-tryptophan. Tryptophan wird sehr leicht racemisiert!

<sup>2)</sup> Hans Fischer, Notiz zum Verhalten des d-Leucyl-l-tryptophans gegen autolytische Fermente. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. 43, S. 1963. 1910.

spalten. Eindeutige Beweise für seine Auffassung sind in seiner Arbeit nicht enthalten. Wie schon erwähnt, war unsere Deutung des Befundes von H. Fischer nur eine allerdings recht wahrscheinliche Vermutung.

Wir haben es nun unternommen, die ganze Frage durch direkte Versuche zu entscheiden. Einmal haben wir d-l-Leucyl-l-tryptophan dargestellt, indem wir inaktives Bromisocapronylbromid mit l-Tryptophan kuppelten. Ferner gewannen wir l-Leucyl-l-tryptophan aus d- $\alpha$ -Bromisocapronylchlorid und l-Tryptophan und schließlich stellten wir noch d-Leucyl-l-tryptophan dar.

Auf diese drei Verbindungen ließen wir Hefepreßsaft einwirken. Da sich Leucyl-t-tryptophan für die optische Methode wegen der Schwerlöslichkeit des Dipeptids nicht gut eignet, haben wir es vorgezogen, nach stattgehabter Einwirkung des Preßsaftes in erster Linie die Spaltprodukte zu isolieren.

### Versuche mit dl-Leucyl-l-tryptophan.

Das zu allen diesen Versuchen verwendete l-Tryptophan drehte in Wasser  $33,5^\circ$  (Konzentration 0,5%) nach links. Es ist dies die höchste Drehung, die wir bis jetzt beobachtet haben. Tryptophan racemisiert sehr leicht. Daher erklären sich auch die sehr verschiedenen Angaben für das Drehungsvermögen des l-Tryptophans. Es ist durchaus nicht ausgeschlossen, daß das von uns angewandte l-Tryptophan optisch nicht ganz rein war und das Drehungsvermögen in Wirklichkeit ein noch höheres ist. Mit der Prüfung dieser Frage sind wir beschäftigt.

Das l-Tryptophan wurde in der üblichen Weise mit inaktivem Bromisocapronylbromid gekuppelt und das Bromisocapronyl-l-tryptophan mit Ammoniak aminiert. Wir machten die gleichen Erfahrungen, wie sie der eine von uns mit Kempe geschildert hat. Es gelang nur schwer und unter sehr großen Verlusten, den Bromkörper zu reinigen. Das aminierte Produkt zeigte keine deutliche Krystallstruktur.

0,1912 g Substanz, bei  $80^\circ$  im Vakuum getrocknet, gaben 0,4508 g  $\text{CO}_2$  und 0,1258 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,1502 g Substanz, bei 80° im Vakuum getrocknet, gaben 17,5 ccm N (20°, 752 mm).

Berechnet für  $C_{17}H_{23}N_3O_3$  (317,2):

64,31% C, 7,31% H und 13,25% N

64,30% C, 7,31% H und 13,24% N.

Von diesem Präparate setzten wir 1 g in 125 ccm Wasser + 10 ccm Hefepreßsaft an. Nach zweistündigem Stehen zeigte sich schon deutlich positive Bromreaktion. Die Kontrollösung: 125 ccm Wasser + 10 ccm Hefepreßsaft zeigte keine Rosafärbung. Nach 48 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Zur Trennung der entstandenen Aminosäuren von dem eventuell nicht gespaltenen d-Leucyl-l-tryptophan fällten wir die mit Schwefelsäure (bis zu 5%) angesäuerte Lösung mit Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag wurde gründlich gewaschen und abgepreßt. Das Filtrat der Fällung befreiten wir mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure. Den Baryt fällten wir mit einem Überschuß von Schwefelsäure, und versetzten das Filtrat vom Baryumsulfat mit Quecksilbersulfat. Aus dem Filtrate der Fällung entfernten wir das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff und fällten dann im Filtrat vom Quecksilbersulfid die Schwefelsäure mit Baryt. Dann engten wir ein. Es gelang, die Krystallisation von l-Leucin herbeizuführen. Die Ausbeute betrug 0,13 g.  $[\alpha]_{20}^D = -15,1^\circ$  (in 20%iger Salzsäure).

Der Quecksilbersulfatniederschlag wurde in der üblichen Weise zerlegt — das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, die Schwefelsäure mit Baryt entfernt —. Das Filtrat vom Baryumsulfat zeigte deutlich die Bromreaktion und drehte in Wasser deutlich nach links. Die Ausbeute an reiner Substanz war gering. Sie betrug nach wiederholtem Umkrystallisieren nur 0,09 g. F.: Bei raschem Erhitzen gegen 260° Gelbfärbung, bei 289° schmilzt das Produkt. Daß die Ausbeute an Tryptophan so gering war, ist nicht verwunderlich. Verharzungsprodukte erniedrigen die Ausbeute stets.

Nun versuchten wir noch das zu erwartende d-Leucyl-l-tryptophan zu gewinnen. Wir zerlegten den Phosphorwolframsäureniederschlag in der üblichen Weise mit Baryt und entfernten den überschüssigen Baryt aus dem Filtrat des phosphorwolframsauren Baryts mit Schwefelsäure. Dann engten wir unter

stark vermindertem Druck ein. Es hinterblieb ein zäher Sirup. Er gab mit Bromwasser keine Rotfärbung. F. gegen  $200^{\circ}$ . Zur Reinigung fällten wir das Produkt mit Quecksilbersulfat und regenerierten es dann wieder in der gewohnten Weise. Die Substanz schmolz nunmehr gegen  $230^{\circ}$ , nachdem sie vorher bei  $222^{\circ}$  angefangen hatte, zu erweichen. In n-Salzsäure gelöst, drehte sie nach links (Tryptophan dreht in n-Salzsäure nach rechts). Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 0,30 g. An Rohprodukt hatten wir 0,48 g gehabt. Wir ließen auf die wässrige Lösung des isolierten Dipeptids nun nochmals Hefepreßsaft einwirken. Nach 48 Stunden war eine minimale Bromreaktion nachweisbar. Sie nahm auch nach 64stündigem Stehen nicht zu. Offenbar war noch etwas Racemkörper vorhanden gewesen.

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

Wir gingen von 5 g l-Tryptophan aus. Die verwendete d-Bromisocaprinsäure zeigte  $[\alpha]_{20}^D = +49,5^{\circ}$ . Das in bekannter Weise<sup>1)</sup> dargestellte Dipeptid zeigte  $[\alpha]_{20}^D = +4,85^{\circ}$  in normaler Salzsäure. Es sinterte beim Erhitzen gegen  $130^{\circ}$  und schmolz gegen  $148^{\circ}$  (korr.). In allen seinen Eigenschaften stimmte es mit dem früher<sup>1)</sup> beschriebenen Präparate überein.

1 g des Dipeptids wurde in 150 ccm Wasser gelöst und die Lösung nach Zusatz von 10 ccm Hefepreßsaft und etwas Toluol 48 Stunden bei  $47^{\circ}$  aufbewahrt. Schon nach 30 Minuten ließ sich deutliche Rosafärbung nach Zusatz von Bromwasser nachweisen. Beim Beginn des Versuches war die Reaktion ganz negativ ausgefallen. Auch hier wurde eine Kontrolle ohne Dipeptidzusatz gleichzeitig beobachtet. Am Schlusse des Versuches war die Bromreaktion sehr intensiv. Auch hier fällten wir mit Phosphorwolframsäure nach vorherigem Ansäuern mit Schwefelsäure. Der Niederschlag war gering. Aus dem Filtrat der Fällung entfernten wir den Überschuß an Phosphorwolfram-

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Abderhalden und Martin Kempe, Synthese von Polypeptiden: Derivate des Tryptophans, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. 40, S. 2737, 1907.

säure mit Baryt und dann aus dem Filtrat des phosphorwolframsauren Baryts den überschüssigen Baryt mit Schwefelsäure. Nun fällten wir in der üblichen Weise mit Quecksilbersulfat das Tryptophan und im Filtrat der Fällung wiesen wir Leucin nach. Wir gewannen 0,42 g l-Leucin.  $[\alpha]_{20}^D = -14,5^\circ$  in 20%iger Salzsäure und 0,32 g l-Tryptophan.  $[\alpha]_{20}^D = -30,5^\circ$  in Wasser gelöst. Unverändertes Dipeptid konnten wir aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag nicht gewinnen. Der schließlich nach der Zerlegung des Niederschlages mit Baryt verbleibende Rückstand gab mit Bromwasser keine Reaktion, wohl aber gab er die Glyoxylsäurereaktion. Es ist möglich, daß noch etwas unverändertes Dipeptid vorlag, es ist jedoch auch denkbar, daß Bestandteile der Hefe die Ursache der Reaktion waren. Jedenfalls war das l-Leucin-l-tryptophan fast ganz und vielleicht auch vollständig in seine Komponenten zerlegt worden.

Mit diesem Resultat stimmt auch folgende Beobachtung überein.

0,0948 g Dipeptid in 10,7066 g Wasser gelöst und 1 ccm Hefepreßsaft zugesetzt.

$\alpha$  im 1 dm-Rohr:

9. August 1910.	5 Uhr	— 0,06°
	5 <sup>35</sup>	— 0,08°
	7	— 0,09°
10. „ „	12 <sup>15</sup>	— 0,15°
	6 <sup>15</sup>	— 0,15°

Die entstandenen Komponenten drehen beträchtlich nach links, es gilt dies sowohl für l-Leucin<sup>1)</sup> als auch für l-Tryptophan.

#### d-Leucyl-l-tryptophan.

Dieses Dipeptid wurde ganz analog wie das eben beschriebene dargestellt. Die angewandte l-Bromisocaprinsäure zeigte  $[\alpha]_{20}^D = -47,2^\circ$ . Das erhaltene Dipeptid zeigte nach

<sup>1)</sup> Hans Fischer irrt, wenn er vom aktiven Leucin sagt, daß es «kaum dreht». Es besitzt  $[\alpha]_{20}^D = -10,34^\circ$  in Wasser gelöst.

wiederholtem Fraktionieren aus Wasser  $[\alpha]_{20}^D = -74,51^\circ$ . 0,2002 g Substanz in n-Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,5201 g.  $d = 1,03$ .  $\alpha$  im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht  $3,40^\circ$  nach links.

F. gegen  $235^\circ$ , nachdem das Präparat bei  $195^\circ$  (korr.) schon geschmolzen war. Diese beiden Schmelzpunkte hat bereits Hans Fischer beobachtet. Auch wir fanden, daß manche Präparate direkt gegen  $235^\circ$  (korr.) schmolzen, ohne vorher zu sintern.

Wir haben das Dipeptid d-Leucyl-l-tryptophan wiederholt dargestellt. Das angegebene Drehungsvermögen ist das höchste, das wir beobachtet haben. Dieses Präparat gab weder mit Hefepreßsaft noch mit Nieren- und Leberpreßsaft noch mit zerhackten Organen (Leber, Muskel) Abscheidung von Tryptophan. Die Bromreaktion blieb negativ, auch konnten wir bei Anwendung von 1 g Dipeptid nach den bei den beiden anderen Dipeptiden geschilderten Methoden weder Leucin noch Tryptophan nachweisen, dagegen gelang es uns, 0,86 g des reinen Dipeptids wiederzugewinnen. Es zeigte nunmehr  $[\alpha]_{20}^D = -70,2^\circ$ . Es war ohne Zweifel bei der Isolierung Racemisierung eingetreten. Dieses Präparat gab nunmehr mit Hefepreßsaft eine ganz geringe positive Bromreaktion. Die gleiche Beobachtung machten wir bei Verwendung von zwei Präparaten, die  $-50,8^\circ$  und  $64,2^\circ$  drehten. Beide gaben stark positive Bromreaktion, wenn sie der Wirkung des Hefepreßsaftes ausgesetzt waren.

Wir glauben, daß diese Resultate genügen, um zu zeigen, daß nur l-Leucyl-l-tryptophan von Zellfermenten (Hefezellen, Leber- und Nierenzellen) gespalten wird — wenigstens gilt dies für den Reagenzglasversuch und die bis jetzt angewandten Bedingungen. Dieser Befund stützt sich auf die folgenden Beobachtungen:

l-Leucyl-l-tryptophan wurde rasch vollständig gespalten. Es konnten l-Leucin und l-Tryptophan in verhältnismäßig guter Ausbeute gewonnen werden.

d-Leucyl-l-tryptophan wird um so weniger gespalten, je größer sein Drehungsvermögen ist. Das optisch reinste

Präparat zeigte überhaupt keine Spaltung. Optisch weniger reine Präparate wurden partiell gespalten — entsprechend dem Gehalt an l-Leucyl-l-tryptophan.

dl-Leucyl-l-tryptophan wurde asymmetrisch gespalten. l-Leucin, l-Tryptophan und d-Leucyl-l-tryptophan blieben übrig.

Unsere Vermutung, daß Hans Fischer mit optisch nicht ganz reinem Material gearbeitet hat, erhält durch unsere Versuche eine weitere Stütze. Wir glauben auch berechtigt zu sein, hervorzuheben, daß die von Hans Fischer angewandte Methode für die von ihm gezogene Schlußfolgerung nicht ausreichte. Da bereits ein großes Versuchsmaterial (Emil Fischer und Emil Abderhalden) vorlag, hätten wir eine zwingendere Beweisführung für angebracht gehalten.

Die asymmetrische Spaltung von racemischen Polypeptiden, speziell von Dipeptiden muß die Möglichkeit eröffnen, aus Racemkörpern optisch einheitliche Verbindungen zu gewinnen. Ist die Spaltung des Polypeptids, das aus Komponenten besteht, die in der Natur vorkommen, eine vollständige, dann muß der Antipode in optisch reinem Zustande zurückbleiben.

Wir erhalten mit dieser Methode leider nicht diejenigen Polypeptide, die uns am meisten interessieren, nämlich die aus den Aminosäuren zusammengesetzten Verbindungen, die in der Natur vorkommen, sondern stets «unnatürliche» Polypeptide. Wir können aber aus dem Drehungsvermögen dieser Produkte Rückschlüsse auf dasjenige der «natürlichen» Polypeptide ziehen. Wir haben zunächst einige bekannte racemische Dipeptide mit Hilfe von Hefepreßsaft asymmetrisch gespalten. Wir verwenden größere Mengen des Dipeptids. Die eingetretene Spaltung ließ sich leicht am Auftreten optischer Aktivität feststellen. Nahm das Drehungsvermögen nicht mehr zu, dann wurde der Versuch abgebrochen und nunmehr isolierten wir die entstandenen Spaltprodukte. Vor allem interessierte uns das Drehungsvermögen des neu entstandenen optisch aktiven Dipeptids. Es seien im folgenden die Werte für das Drehungsvermögen der erhaltenen Dipeptide denen in der Literatur vorhandenen gegenübergestellt.

l-Leucyl-glycin  $[\alpha]_{20}^D = + 85,99^{\circ}$  <sup>1)</sup> in wässriger Lösung.  
 Glycyl-l-leucin  $[\alpha]_{20}^D = - 35,1^{\circ}$  <sup>2)</sup>

Gefunden für die Antipoden nach erfolgter Spaltung der entsprechenden Racemkörper mit Hilfe von Hefepreßsaft:

d-Leucyl-glycin  $[\alpha]_{20}^D = - 88,15^{\circ}, - 87,87^{\circ}, - 88,50^{\circ}$ .

Glycyl-d-leucin  $[\alpha]_{20}^D = - 37,62^{\circ}$  und  $+ 37,10^{\circ}$ .

Es wurde in beiden Fällen ein etwas höheres Drehungsvermögen erreicht. Es ist natürlich immer noch fraglich, ob die von uns erhaltenen Werte nun das absolute Drehungsvermögen darstellen, d. h. ob wir optisch ganz reine Dipeptide in Händen hatten. Wir haben die Methoden zur Isolierung der Dipeptide so indifferent als möglich gewählt und ferner bei wiederholtem Umkrystallisieren keine Änderung des Drehungsvermögens beobachtet, immerhin gibt es zurzeit wohl keine Anhaltspunkte, um für optische Reinheit eine absolute Garantie zu geben. Wir haben jeden Versuch wiederholt durchgeführt. Das einmal achteten wir mehr auf den quantitativen Verlauf der Spaltung, das anderemal verzichteten wir auf gute Ausbeuten und suchten durch vielfaches Fraktionieren ein möglichst hohes Drehungsvermögen zu erreichen. Daß wir sehr reine Körper in Händen hatten, geht schon daraus hervor, daß mehrere Krystallfraktionen genau das gleiche Drehungsvermögen gaben. Ferner lieferten die einzelnen Versuche auch gleiche Resultate. Wir haben den Verlauf der Spaltung des Racemkörpers mit Hilfe von Hefepreßsaft teils durch Bestimmung des Drehungsvermögens des Fermentsubstratgemisches verfolgt, zum Teil benützten wir die Methode von van Slyke, <sup>3)</sup> um den Aminostickstoff in der Flüssigkeit zu bestimmen. Beim

<sup>1)</sup> Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XV., Berichte der Deutsch. chem. Ges., Jg. 39. S. 2893, 1906.

<sup>2)</sup> Emil Fischer und Joseph Steingroever, Synthese von Polypeptiden. XXIX. Derivate des l-Leucins, d-Alanins und Glykokolls. Liebigs Annalen der Chemie, Bd. 365, S. 167, 1909.

<sup>3)</sup> Donald D. van Slyke, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen; einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme. Ber. der Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. 43. S. 3170, 1910.

Leucyl-glycin erhielten wir sehr scharfe Werte. Genau 50% des Racemkörpers wurden gespalten. Beim Glycyl-leucin versagte die Methode. Vgl. hierzu Emil Abderhalden und Donald D. van Slyke: Die Bestimmung des Aminostickstoffs in einigen Polypeptiden nach der Methode von van Slyke. Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 505, 1911.

Es sei im folgenden je ein Versuch mitgeteilt.

### 1. Spaltung von dl-Leucyl-glycin mit Hilfe von Hefepreßsaft.

Angewandt 10 g Dipeptid. Diese Menge wurde in 190 ccm Wasser gelöst. Nach Zusatz von 10 ccm aktivem, frisch bereitetem Hefepreßsaft stellten wir die sorgfältig verschlossene Flasche in den Brutschrank. An jedem Tage wurde durch Probeentnahme das Drehungsvermögen der Lösung festgestellt. Änderte sich dieses nicht mehr, dann betrachteten wir den Versuch als abgeschlossen und gingen an die Isolierung der Spaltprodukte. Es ließ sich auch berechnen — wenigstens annähernd —, ob dem zuletzt erhaltenen Drehungsvermögen eine vollständige Spaltung des Dipeptids l-Leucyl-glycin entsprach. Die Lösung mußte unter der Voraussetzung, daß die asymmetrische Spaltung vollständig war, 5 g d-Leucyl-glycin und ferner die aus 5 g l-Leucyl-glycin stammenden Mengen l-Leucin und Glykokoll enthalten. l-Leucin dreht in Wasser —  $10,34^\circ$ , d-Leucyl-glycin —  $86^\circ$ .

Versuch begonnen am 13. Juni 1911.

	$\alpha$	— 0,04°
14. VI.		— 1,19°
15. VI.		— 2,01°
16. VI.		— 2,03°
17. VI.		— 2,23°.

Von da ab trat keine Änderung des Drehungsvermögens mehr ein. Der Hefepreßsaft selbst drehte nur ganz geringfügig ( $0,2^\circ$ ). Kontrollösungen zeigten, daß er sein Drehungsvermögen im Laufe des Versuches kaum änderte. Die Verdauungsflüssigkeit hatte sich im Laufe des Versuches etwas getrübt. Der Versuch, durch direkte Krystallisation die entstandenen Ver-

bindungen zu gewinnen, gab keine guten Resultate. Die mit dem Hefepreßsaft zugeführten Stoffe störten. Ferner war das zugesetzte Toluol hinderlich. Wir gingen nun ganz allgemein, wie folgt, vor. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck bei  $35^{\circ}$  des Wasserbades vollständig zur Trockene verdampft. Den Rückstand übergossen wir mit Alkohol und engten nochmals ein. Auf diese Weise ließen sich aus der Hefe stammende Produkte in unlöslichen Zustand überführen. Nun lösten wir den Destillationsrückstand in heißem Wasser und kochten die Lösung mit Tierkohle. Das Filtrat war wasserklar. Beim Abkühlen schieden sich Krystalle aus. Wie die Eigenschaften und das Drehungsvermögen zeigten, handelte es sich um l-Leucin.

Auch die nächsten Krystallfraktionen bestanden zum größten Teil aus Leucin, dann folgten Mischungen von Dipeptid und Leucin. Um eine möglichst quantitative Trennung herbeizuführen, verwandelten wir den Inhalt der ganzen Mutterlauge des reinen Leucins, der wir auch die unreinen Fraktionen zugefügt hatten, durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd in das Kupfersalz. Wir kochten das ungelöst gebliebene Kupferoxyd so lange mit Wasser aus, bis das Filtrat keine Spur einer Blaufärbung mehr zeigte. Es war nun verhältnismäßig leicht, das sehr schwer lösliche Leucinkupfer vom Dipeptidkupfersalz zu trennen, dagegen war es nicht möglich, letzteres ganz frei von Glykokollkupfer zu erhalten. Wir haben deshalb nach Abscheidung des Leucinkupfers die ganze Mutterlauge mit Schwefelwasserstoff zerlegt und dann das Glykokoll als Pikrat isoliert. Aus dem Filtrat entfernten wir nach erfolgtem Ansäuern mit Schwefelsäure die Pikrinsäure mit Äther, dann fällten wir die Schwefelsäure mit Baryt und engten ein. Vorteilhafter ist es, Glykokoll und Dipeptid durch fraktionierte Krystallisation zu trennen. Die Unterschiede in der Löslichkeit sind groß genug, um eine scharfe Trennung durchzuführen. Bei einem Versuch, Leucyl-glycin durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol bis zur beginnenden Trübung abzuscheiden, erfolgte auffallenderweise Krystallisation des gesamten Glykokolls in prachtvollen Krystallen, während das Dipeptid quantitativ in Lösung blieb. Das Glykokoll war absolut rein. Es zeigte keine Spur einer Drehung, und

das Dipeptid, das durch Eindampfen der Mutterlauge gewonnen war, zeigte  $[\alpha]_{20}^D = -87,2^\circ$ . Es war somit sehr rein.

0,6612 g Leucin in 20%iger Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung: 15,1256 g.  $d = 1,1$ .  $\alpha = 0,78^\circ$  nach links im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht.

$$[\alpha]_{20}^D = -16,22^\circ.$$

0,6340 g d-Leucyl-glycin in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung: 6,3285 g.  $d = 1,0312$ .  $\alpha = 9,10^\circ$  nach links im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht.

$$[\alpha]_{20}^D = -88,15^\circ.$$

Die Ausbeute an den einzelnen Spaltprodukten war eine recht gute. Vom aktiven Dipeptid gewannen wir 4,75 g, vom l-Leucin 2,3 g und vom Glykokoll 2,5 g. Der Versuch zeigt, daß es sehr leicht möglich ist, mit Hilfe von Hefepreßsaft bestimmte racemische Dipeptide quantitativ zu spalten. Zur Kontrolle des Drehungsvermögens von synthetisch dargestellten optisch aktiven Polypeptiden ist die angewandte Methode sehr gut geeignet. Wir haben noch mehrere derartige Versuche durchgeführt. Das Resultat war stets das gleiche. Für das d-Leucyl-glycin fanden wir  $[\alpha]_{20}^D = -87,87^\circ$  und  $-88,50$ . Der letztere Wert ist der höchste, den wir bis jetzt beobachtet haben.

Ein nach der Methode von van Slyke kontrollierter Versuch gab folgendes Resultat:

1 g dl-Leucyl-glycin in 100 ccm Wasser gelöst und 10 ccm Hefepreßsaft zugesetzt. Nach achttägigem Stehen Aminostickstoff bestimmt. Gefunden wurde:

NH<sub>2</sub>-Stickstoff 0,1227 g

Davon entfallen auf den zugesetzten

Hefepreßsaft (Kontrollbestimmung) 0,0093 »

0,1134 g

1 g dl-Leucyl-glycin enthält 0,1489 g Gesamtstickstoff. Der NH<sub>2</sub>-N beträgt hiervon die Hälfte = 0,07445 g N. Bei der asymmetrischen Spaltung bleibt d-Leucyl-glycin übrig und zwar 0,5 g. Diese Menge enthält 0,037225 g N als Amidstickstoff. 0,5 g l-Leucyl-glycin sind gespalten worden. Es kommt

somit der gesamte Stickstoff dieser Komponenten als  $\text{NH}_2$ -Stickstoff zur Bestimmung = 0,07445 g N. Somit berechnet sich der gesamte in der Flüssigkeit vorhandene Amidstickstoff unter der Voraussetzung, daß 1 g dl-Leucyl-glycin in 0,5 g d-Leucyl-glycin gespalten worden ist und der Rest des Racemkörpers in seine Komponenten zerfallen ist: auf 0,111675 g N. Dieser Wert stimmt mit dem gefundenen sehr gut überein.

### Spaltung von Glycyl-dl-leucin mit Hilfe von Hefepreßsaft.

Angewandt 4 g Dipeptid, 60 ccm Wasser und 10 ccm Hefepreßsaft. Die Anfangsdrehung betrug  $+ 0,08^\circ$ . Am zweiten Tag wurde im 1 dm-Rohr  $+ 0,38^\circ$  abgelesen, am dritten Tag  $+ 0,84^\circ$ , am vierten  $+ 0,84^\circ$ , am fünften  $+ 0,88^\circ$ . Von da ab erschwerte eingetretene Trübung die Ablesung außerordentlich. Wir ließen die Lösung noch drei Tage bei  $37^\circ$  und verarbeiteten sie dann genau wie im vorhergehenden Falle. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingedampft, dann der Rückstand in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle behandelt und nunmehr das l-Leucin zunächst durch einfache Krystallisation abgetrennt. Den Rest des Leucins gewannen wir über das Kupfersalz. Dipeptid und Glykokoll trennten wir durch Krystallisation, bei einem späteren Versuch mit Hilfe des Pikrates. Das Resultat war im letzteren Fall nicht so gut. Es scheint Dipeptid mitzukrystallisieren.

0,6558 g l-Leucin in 20%iger Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 14,7512 g.  $d = 1,1$ .  $\alpha = 0,78^\circ$  nach links im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht.

$$[\alpha]_{20}^D = - 15,93^\circ.$$

0,7082 g Dipeptid in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 16,8201 g.  $d = 1,01$ .  $\alpha = 1,60^\circ$  nach rechts im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht.

$$[\alpha]_{20}^D = + 37,62^\circ.$$

Bei einem anderen Versuche erhielten wir eine etwas geringere Drehung:  $+ 37,10^\circ$ . In den Eigenschaften stimmten die erhaltenenen Dipeptide gut überein mit denen der Anti-

poden. Vom d-Leucyl-glycin und vom Glycyl-d-leucin ließen sich aus Wasser leicht makroskopische Krystalle züchten.

Wir glauben, durch diese Versuche bewiesen zu haben, daß die Spaltung durch Hefepreßsaft eine gute Methode darstellt, um aus Racemkörpern optisch aktive Polypeptide in reinem Zustand zu gewinnen. Sie ist allerdings nicht allgemein anwendbar, indem manche Dipeptide der Spaltung widerstehen. So wurden Glycyl-dl-phenylalanin und dl-Leucyl-dl-phenylalanin unverändert zurückgewonnen. Es sind im Laboratorium des einen von uns noch zahlreiche Dipeptide in analoger Weise gespalten worden. Die erhaltenen Resultate sollen später mitgeteilt werden. Wir verfolgen mit diesen Untersuchungen nicht nur den Zweck, optisch möglichst reine Dipeptide zu gewinnen, sondern es sollen gleichzeitig die Eigenschaften möglichst vieler optisch aktiver Polypeptide auf diesem Wege bekannt werden. Es ist in vielen Fällen sehr schwierig, dasjenige optisch aktive Polypeptid zu gewinnen, das sich aus den Komponenten zusammensetzt, die in der Natur vorkommen. Hat man die Racemkörper, die meist ohne Schwierigkeiten zu beschaffen sind, so kann man durch das Studium der Antipoden manchen wertvollen Wink zur Untersuchung der bei der partiellen Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte erhalten.