

Synthetische Polypeptide. Derivate des Poly-DL-Phenylalanins.

IV. Mitteilung über Peptide¹.

Von

K. Schlögl, F. Wessely und G. Korger.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 21. April 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Mai 1952.)

Von den zahlreichen, bisher beschriebenen synthetischen Polypeptiden² scheint solchen mit funktionellen Gruppen besonderes Interesse zuzukommen. Wie *M. A. Stahmann* und Mitarbeiter³ vor kurzem zeigen konnten, besitzen Poly-Lysine die Fähigkeit, die Vermehrung von Tabakmosaikvirus zu hemmen, was auf eine Kombination des sauren Virus-Nucleoproteins mit den zahlreichen Aminogruppen des Poly-Lysins zurückzuführen sein dürfte.

Diese interessante Beobachtung hat uns — wie schon in der vorigen Mitteilung angedeutet¹ — veranlaßt, Polypeptide von α,ω -Diaminomonocarbonsäuren darzustellen, deren biologische Aktivität im oben erwähnten Sinn untersucht werden soll.

Zur Darstellung von Polypeptiden mit vielen freien Aminogruppen schienen Derivate des Phenylalanins geeignet, da es 1. leicht möglich sein mußte, von geeigneten substituierten Poly-Phenylalaninen zu Poly-Amino-peptiden (wie Polypeptide mit zahlreichen Aminogruppen in Hinkunft kurz genannt werden sollen) zu gelangen, 2. das p-Aminophenylalanin bereits als solches biologisch aktiv im Sinne einer Wachstums-

¹ III. Mitteilung: *F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger*, Mh. Chem. **83**, 678 (1952).

² *E. Katchalski*, Adv. Prot. Chem. **6**, 123 (1951).

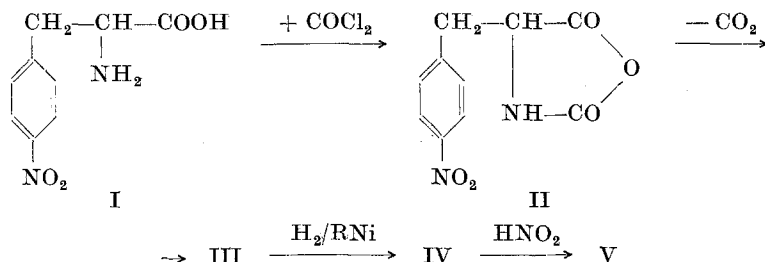
³ *M. A. Stahmann, L. H. Graf, E. L. Patterson, J. C. Walker und D. W. Watson*, J. biol. Chemistry **189**, 45 (1951). — *W. C. Burger und M. A. Stahmann*, ebenda **193**, 12 (1951).

hemmung von *E. coli* noch in einer Konzentration von 0,5 γ /ml erkannt wurde⁴ und wir 3. bereits gewisse Erfahrungen bei der Darstellung von Phenylalanin-peptiden besaßen⁵.

Im Zuge dieser Arbeiten wurden Versuche zur Darstellung des Poly-DL-p-Nitrophenylalanins III, des Poly-DL-p-Aminophenylalanins IV und des Poly-DL-Tyrosins V angestellt. Hierüber soll im folgenden berichtet werden.

Synthetische Polypeptide werden heute ausschließlich durch Polymerisation der α -Amino-N-carbonsäureanhydride dargestellt². Da diese Anhydride aber vor allem mit Aminen und Alkoholen lebhaft reagieren, ist es zur Darstellung von Poly-Amino-peptiden notwendig, die nicht α -ständige Aminogruppe vor Darstellung des Anhydrides mit einer solchen Gruppe zu substituieren, die eine Reaktion mit dem Anhydrid verhindert, sich aber aus dem Polypeptid leicht wieder entfernen läßt. Dazu wurde bisher bei der Darstellung des Poly-Lysins⁶ und des Poly-Ornithins⁷ — den beiden einzigen bisher beschriebenen Poly-Amino-peptiden — die Cbz-Gruppe verwendet, die aus den Poly-N-Cbz-aminopeptiden mit Phosphoniumjodid und Wasserstoff reaktiv eliminiert wird.

Wir wählten den zweiten prinzipiell möglichen Weg, der bisher noch nicht beschritten worden war, nämlich eine gegenüber dem N-Carbonsäureanhydrid reaktionsträge Gruppe nach erfolgter Polymerisation erst im Polypeptid in die Aminogruppe überzuführen. Eine solche Gruppe lag in der Nitrogruppe vor. Es wurde also das Poly-p-Nitrophenylalanin III dargestellt, das dann zur Polyaminoverbindung IV reduziert werden konnte. Diazotieren dieses Produktes und anschließendes Verkothen führte zu einem Poly-DL-Tyrosin V, dessen Einheitlichkeit allerdings sehr fraglich ist, da wir bei seiner Hydrolyse nur 70% Tyrosin auffinden konnten. Nachstehendes Formelschema möge die Zusammenhänge verdeutlichen:

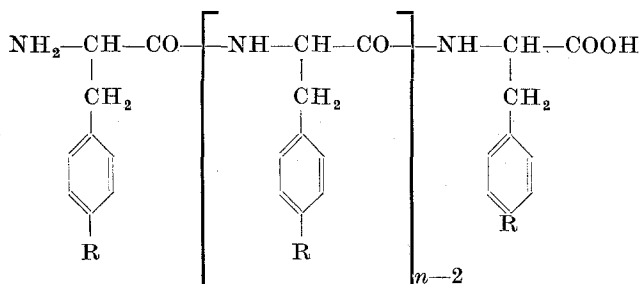


⁴ J. H. Burckhalter und V. C. Stephens, J. Amer. chem. Soc. **73**, 56 (1951).

⁵ F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. **82**, 671 (1951).

⁶ E. Katchalski, I. Großfeld und M. Frankel, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2094 (1948). — R. R. Becker und M. A. Stahmann, ebenda **74**, 38 (1952).

⁷ E. Katchalski und P. Spitnik, Nature (London) **164**, 1092 (1949); J. Amer. chem. Soc. **73**, 3992 (1951).


 III: R = NO₂

 IV: R = NH₂

V: R = OH

Poly-DL-p-Nitro-phenylalanin.

Das als Ausgangsmaterial benötigte p-Nitrophenylalanin I wurde in guten Ausbeuten durch Umsetzung von Formylaminomalonester mit p-Nitrobenzylchlorid und Erhitzen des substituierten Malonesters mit konz. Salzsäure erhalten. A. Dornow und G. Winter⁸ haben in einer neueren Arbeit, die uns erst nach Abschluß unserer Versuche bekannt wurde, p-Nitrophenylalanin-äthylester auf demselben Wege dargestellt, ohne aber den p-Nitrobenzyl-formylaminomalonester zu isolieren. I konnte durch Behandeln mit Phosgen bei 40° in absol. Tetrahydrofuran quantitativ in das N-Carbonsäureanhydrid II übergeführt werden. Dieses war leicht kristallin zu erhalten und erwies sich gegenüber dem DL-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid insofern als stabiler, als es auch nach längerem Stehen an der Luft und bei Behandeln mit feuchten Lösungsmitteln nur in geringem Maße zur Selbstpolymerisation neigte.

Poly-Nitrophenylalanin war schon von Th. Curtius und W. Mühlhäuser⁹ erhalten worden. Die Verkochung der p-Nitrobenzyl-malonazidsäure lieferte statt des zu erwartenden N-Carbonsäureanhydrids II sofort das Polymere, das nicht näher untersucht wurde. Durch Hydrolyse desselben wurde p-Nitrophenylalanin dargestellt.

Von den verschiedenen Versuchen zur Polymerisation von II erwies sich die thermische Polymerisation in absol. Nitrobenzol am geeignetsten. Beim trockenen Erhitzen im Vakuum über den Schmelzpunkt (184°) wurde bei verschiedenen Präparaten und unter verschiedenen Bedingungen immer nur bis 92% der theoretischen CO₂-Menge abgespalten, eine Tatsache, die zunächst nicht erklärt werden kann. Das erhaltene Produkt war außerdem ziemlich gefärbt und zeigte deutlich positiven

⁸ Chem. Ber. 84, 307 (1951).

⁹ J. prakt. Chem. (2), 125, 291 (1930).

Pikrinsäuretest auf Diketopiperazine¹⁰. Auch Polymerisation in absol. Cyclohexanon und Tetrahydrofuran führte zu stärker gefärbten Produkten, während in absol. Pyridin ein helles Polymeres erhalten werden konnte.

Wir haben zur Darstellung des Polymeren III das frisch umgelöste und sorgfältig getrocknete Anhydrid II in einer größeren Menge absol. und frisch destilliertem Nitrobenzol gelöst, mit zirka 1% an niederen Polymeren als Startsubstanz versetzt und 10 Tage auf 100° erhitzt. Diese niedrigen Polymeren wurden primär aus einem Versuch, wo als Startsubstanz Wasser verwendet worden war, gewonnen. Die verhältnismäßig große Reaktionsträgheit von II geht auch aus der Tatsache hervor, daß eine Probe noch nach 2 Tagen deutlich positive Reaktion mit Anilin zeigte. Nach 10 Tagen hatten sich 68% d. Th. an Polymeren abgeschieden, welche nach dem Absaugen mit Alkohol und Äther gewaschen und zur Reinigung mit absol. Essigester und absol. Alkohol ausgekocht wurden, wobei eine geringe Menge in Lösung ging, die mit der Nitrobenzolvermutterlauge vereinigt wurde. Diese lieferte den Rest der Substanz in Form von niedrigen Polymeren, die — wie die Bestimmung des Aminostickstoffs nach *van Slyke* ergab — ein mittleres Molgewicht von 2160 und damit eine mittlere Kettenlänge von $n = 11$ besaßen. Das Polymere III stellt ein fast farbloses Pulver dar, das sich ab 300° verfärbt und von 340 bis 345° zersetzt. Es ist in den gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich, nur in Dimethylformamid, besonders in der Wärme leicht löslich. Während die Ninhydrin- und die Pikrinsäurereaktion der niedrigen Polymeren ganz schwach positiv waren, sind beide Reaktionen beim höheren Polymeren absolut negativ. III gab nach mehrtägiger Extraktion mit Äther die berechneten Analysenwerte und lieferte bei der Druckhydrolyse mit konz. Salzsäure bei 160° im Rohr (Kochen unter Rückfluß bewirkte selbst nach 56 Stdn. nur teilweise Lösung) ein Hydrolysat, in dem papierchromatographisch nur p-Nitrophenylalanin nachgewiesen werden konnte und das nach Bestimmung des Aminostickstoffs und der quantitativen spektrophotometrischen Bestimmung des darin enthaltenen p-Nitrophenylalanins zu über 95% diese Aminosäure enthält. Abb. 1 zeigt die UV-Absorptionsspektren des p-Nitro- und p-Aminophenylalanins, die zur quantitativen Bestimmung dieser Aminosäuren in Hydrolysaten herangezogen wurden. Beide Aminosäuren zeigen nur die charakteristische Absorption des Nitrobenzols bzw. des Anilins, während die charakteristische Absorption des p-Aminophenylalanins in salzsaurer Lösung verschwindet.

Das Molgewicht und die mittlere Kettenlänge von III wurden durch Bestimmung des Aminostickstoffs nach der von *D. G. Doherty* und

¹⁰ *E. Abderhalden* und *E. Komm*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **139**, 181 (1924).

C. L. Ogg¹¹ für unlösliche Proteine modifizierten *van Slyke*-Methode zu 7300 bzw. 38 ermittelt.

Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der von den beiden Polymeren entwickelten Aminostickstoffmenge von der Zeit.

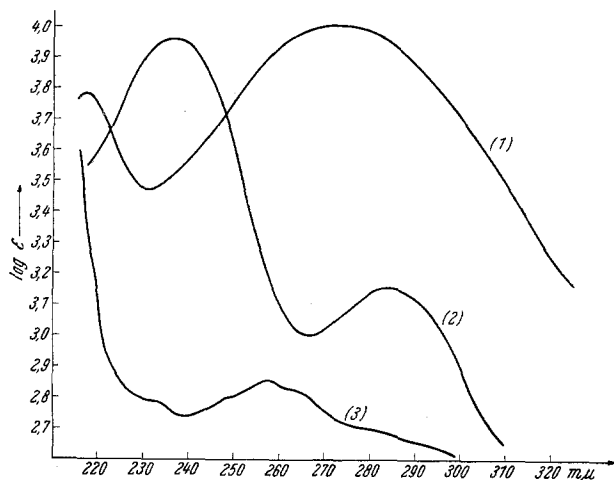


Abb. 1. UV-Spektren von p-Nitro- und p-Aminophenylalanin.

- (1) p-Nitrophenylalanin in HCl (1:50).
- (2) p-Aminophenylalanin in Wasser.
- (3) p-Aminophenylalanin in HCl (1:50).

Der nächste und wichtigste Schritt war die Reduktion des Polynitropeptides III zum Poly-Aminopeptid IV. Um Vergleichsmöglichkeiten für diese Reduktion zu besitzen, sowie um die einfachsten Glieder der beiden Polypeptide, nämlich das Dipeptid VI des p-Nitrophenylalanins und des p-Aminophenylalanins kennenzulernen, haben wir VI nach dem Azlaktonverfahren dargestellt, das sich schon zur Synthese des DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanins als sehr geeignet erwiesen hat⁵ und seine Brauchbarkeit auch in diesem Fall unter Beweis stellte.

Aus dem p-Nitrophenylalaninester und dem Azlakton VII, das zum Unterschied vom entsprechenden unsubstituierten Phenylalaninazlakton sich als ziemlich unbeständig — vor allem gegen thermische Einflüsse — erwiesen hat, konnte der N-Acetyldipeptidester VIII gewonnen werden, der bei Behandlung

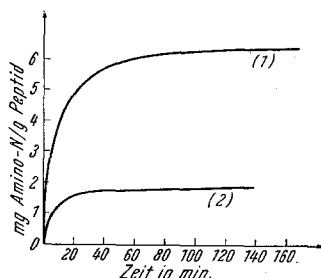


Abb. 2. Entbindung von Amino-N aus Poly-Nitrophenylalaninen.

- (1) Niedrige Polymere ($n = 11$).
- (2) Poly-p-Nitrophenylalanin (III, $n = 38$).

¹¹ Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **15**, 751 (1943).

polymeren aussichtslos erschien, blieb uns als Lösungsmittel für die Hydrierung nur Dimethylformamid. Während aber Reduktionen von Nitrogruppen zu Aminogruppen unter Normalbedingungen im allgemeinen glatt und rasch verlaufen, war hier unter normalem Druck und bei Zimmertemp. mit *Raney*-Nickel nur immer eine partielle Hydrierung zu erzielen, was aus der Papierchromatographie der Hydrolysate der erhaltenen Produkte hervorging. Diese enthielten durchwegs noch p-Nitrophenylalanin neben p-Aminophenylalanin im ungefähren Verhältnis 1:1 (Schätzung der Fleckengröße). Es handelt sich dabei also um Mischpolymere aus den beiden Aminosäuren, die ähnliche Löslichkeitseigenschaften wie das Poly-Nitrophenylalanin zeigten und noch in Säuren unlöslich waren. Außerdem dürfte aber — zumindest teilweise — die Hydrierung auch zu Hydrazoverbindungen (und eventuell Azoxyverbindungen) geführt haben, da wir aus den Rohprodukten mit Alkohol Substanzen isolieren konnten, die typische Eigenschaften von Hydrazoverbindungen zeigten. Sie wurden beim Stehen an der Luft tiefrot (Oxydation zur Azostufe) und entfärbten sich bei Reduktion wieder.

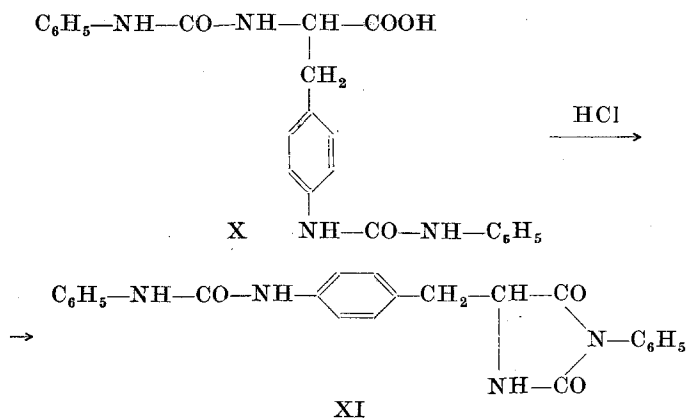
Im UV-Spektrum des Hydrolysates dieser Mischpolymeren fand sich außerdem neben dem charakteristischen Maximum des p-Nitrophenylalanins bei 272 $m\mu$ (da in saurer Lösung gemessen wurde, machte sich die Absorption des Aminophenylalanins, wie auch aus Abb. 1 hervor geht, nicht mehr bemerkbar) ein 2. Maximum bei 244 $m\mu$. Aus der Extinktion bei 272 $m\mu$ wurde die Konzentration des p-Nitrophenylalanins im Hydrolysat zu zirka 50% berechnet, was mit den papierchromatographischen Befunden in gutem Einklang steht.

Da diese Verhältnisse — die nur partielle Reduktion der Nitrogruppen — zweifellos auf eine ziemlich starke Inaktivierung der Katalysatoren durch das Dimethylformamid, die sich auch durch die starke Verminderung der Wasserstoffaufnahme beim Aushydrieren dieser Katalysatoren bemerkbar machte, zurückzuführen war, haben wir diese Einflüsse durch Erhöhung von Druck und Temperatur kompensiert und konnten tatsächlich unter Verwendung von *Raney*-Nickel bei 70 Atm. Wasserstoffdruck und 100° ausgezeichnete Ausbeuten an dem gewünschten Poly-Aminophenylalanin IV erhalten, das nach Papierchromatographie des Hydrolysates und quantitativer spektrophotometrischer Bestimmung des p-Aminophenylalanins im Hydrolysat quantitativ aus dieser Aminosäure aufgebaut ist und keine Spur p-Nitrophenylalanin mehr enthält.

Bei dem Poly-Amino-peptid IV handelt es sich um ein ganz schwach bräunlich gefärbtes Pulver, das in Wasser, Alkohol, Aceton und Benzol unlöslich, leicht löslich dagegen in Dimethylformamid, Eisessig, Pyridin, Morpholin und in verd. und konz. Mineralsäuren ist und das sich ab 200° unter Braunfärbung allmählich zersetzt. Zur Reinigung wird es am besten in Dimethylformamid gelöst und mit Äthanol ausgefällt.

Auch nach mehrtägiger Extraktion mit Äther und scharfem Trocknen liegen die C-Werte bis zu 4% unter den berechneten, was durch ein hartnäckiges Binden von Lösungsmittel zu erklären sein dürfte.

Zum Beweis für die Struktur von IV haben wir außer der erwähnten quantitativen Bestimmung des p-Aminophenylalanins dieses auch noch chemisch in Hydrolysaten, nämlich sowohl in Substanz selbst, als auch in Form der gut krist. Phenylisocyanatverbindung X, die bei Säurebehandlung leicht in das Hydantoin XI übergeht, nachgewiesen. Die Di-DNP-Verbindung eignet sich zur Charakterisierung weniger gut, da sie, wie bereits erwähnt, nur amorph zu erhalten ist.

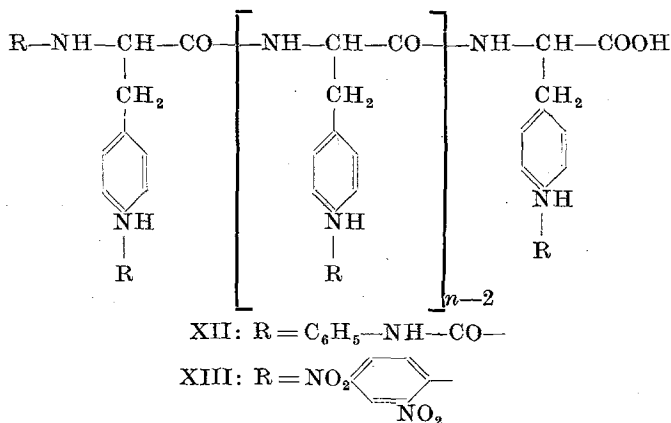


Da zumindest anfänglich — vor der quantitativen Bestimmung des p-Aminophenylalanins — auch mit einem teilweisen Vorliegen von p-Nitrophenylalanin und eventuell auch p-Nitro-hexahydro-phenylalanin zu rechnen war, wurden auch von diesen beiden Aminosäuren für Vergleichszwecke die DNP- und Phenylisocyanatverbindungen dargestellt. Außerdem haben wir die UV-Spektren von den bisher erwähnten DNP-Verbindungen in alkohol. Lösung aufgenommen. Dabei ergab sich, daß die Kurven für das Di-DNP-p-Aminophenylalanin, das Tri-DNP-Aminophenylalanin-dipeptid und das Di-DNP-p-Amino-hexahydrophenylalanin praktisch identisch waren. In der Abb. 3 findet sich daher neben dem DNP-p-Nitrophenylalanin nur die Kurve des Di-DNP-Amino-hexahydrophenylalanins, da es sich bei dieser Verbindung um eine gut kristallisierende Substanz handelt.

Das bisher nicht beschriebene DL-p-Amino-hexahydrophenylalanin konnte aus dem p-Nitrophenylalanin durch katalytische Hydrierung mit PtO_2 in Salzsäure in Form des hygroskopischen Chlorhydrats dargestellt werden. Die freie Aminosäure wurde nur als ebenfalls hygroskopisches, nicht kristallisierendes Produkt erhalten, das in Form seines Esters

sowie der erwähnten gut krist. Phenylisocyanat- und der DNP-Verbindung charakterisiert werden konnte.

Zur Identifizierung des Poly-Aminopeptides IV haben wir das Chlorhydrat, den Poly-Harnstoff XII durch Umsetzung mit Phenylisocyanat und die Poly-DNP-Verbindung XIII dargestellt.



Allerdings lagen beim Chlorhydrat und bei XII die Chlor- bzw. N-Werte etwas zu tief, was darauf zurückzuführen sein dürfte, daß nicht alle Aminogruppen mit HCl bzw. Phenylisocyanat reagiert haben.

Nach all den bisher erwähnten Befunden scheint die Struktur des bei der Hydrierung von III erhaltenen Produktes als die eines Poly-DL-p-Aminophenylalanins IV gesichert und es blieb nur noch die Frage des mittleren Molgewichtes und damit des mittleren Polymerisationsgrades n offen. Wenn diese beiden Werte auch für das Poly-Nitroprodukt III bekannt waren, konnten sie doch nicht ohne Vorbehalt für das daraus erhaltene Poly-Amin IV übernommen werden, da unter den Bedingungen der Hydrierung eine Sprengung von Peptidbindungen nicht ausgeschlossen schien. Die Bestimmung des Molgewichtes nach *van Slyke* war von

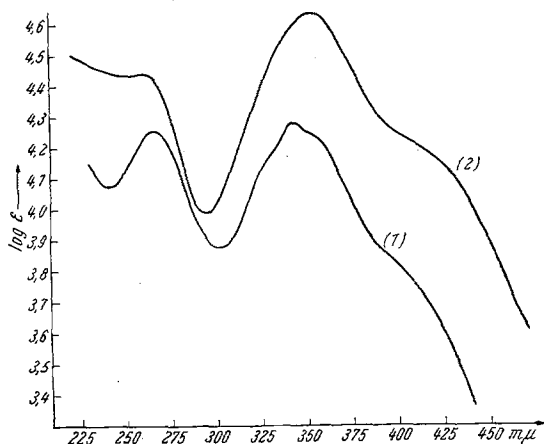


Abb. 3. UV-Spektren von DNP-Aminosäuren.
 (1) DNP-p-Nitrophenylalanin in Äthanol.
 (2) Di-DNP-p-Amino-hexahydro-phenylalanin in Äthanol.

vornherein nicht anwendbar, da mit einer zumindest teilweisen Stickstoffentwicklung auch aus den aromatischen Aminogruppen gerechnet werden mußte. Dialyseversuche mit Cellophanmembranen und wäßrigem Pyridin als Lösungsmittel zeigten, daß rund 18% von IV einen Polymerisationsgrad hatten, der kleiner als zirka 20 war, während Verestern mit äthanol. HCl durch 3 Stdn. bei Zimmertemp. und Bestimmung des Äthoxylgehaltes einen mittleren Wert für $n = 38$ lieferte, der in gutem Einklang mit dem Wert für das Poly-Nitrophenylalanin steht. Verestern mit methanol. HCl durch 24 Stdn. ergab dagegen ein n von 25.

Allerdings dürfen diese Werte keinen strengen Anspruch auf Gültigkeit erheben, da das Polymere bei der Behandlung mit der alkohol. HCl nicht in Lösung ging und eine quantitative Veresterung daher nicht gewährleistet scheint, während umgekehrt mit einer Spaltung der Peptidketten, besonders aber bei der 24stündigen Behandlung, zu rechnen ist.

Auch die DNP-Methode zur Endgruppenbestimmung, wie sie von *Katchalski* und Mitarbeitern⁶ mit gutem Erfolg zur Bestimmung des Molgewichts von Poly-Lysin verwendet worden war, schien in unserem Falle wenig aussichtsreich. Einerseits deshalb, weil infolge der heterogenen Umsetzung des wasserunlöslichen Poly-Amino-peptids IV mit DNFB eine quantitative Substitution aller Aminogruppen des Poly-Amins IV nicht mit Sicherheit angenommen werden konnte, anderseits weil das Di-DNP-p-Aminophenylalanin unter den zur völligen Hydrolyse des DNP-Polymeren nötigen Bedingungen bereits selbst in sehr starkem Maße (bis zu 50%) angegriffen wird.

Es kann also über die Molgröße des Polymeren IV keine sichere Aussage gemacht werden, doch scheint es wahrscheinlich, daß sich n in der Größenordnung 30 bis 35 bewegt und somit bei der Hydrierung, wenn überhaupt, nur in geringem Maße eine Sprengung von Peptidbindungen eingetreten ist*.

Ein weiterer Weg zur Darstellung von Poly-Aminophenylalaninen schien in der direkten Hydrierung des N-Carbonsäureanhydrides II zu liegen.

Die primär durch Reduktion gebildeten Aminogruppen des Anhydrides könnten als Starter für die Polymerisation dienen, während gebildetes Polymeres weiter hydriert würde. Allerdings war mit Vernetzungen der Peptidketten untereinander zu rechnen, da ja das Anhydrid auch mit den aromatischen Aminogruppen anderer Ketten reagieren konnte. Diese „hydrierende Polymerisation“, die wir in absol. Essigester unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Katalysatoren durch-

* *Anmerkung während der Korrektur:* Inzwischen wurde das mittlere Molgewicht von IV nach der Methode von *K. Schwarz* [Mh. Chem. **53/54**, 926 (1929)] in Pyridin zu 6570 ($n=40$) bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit dem für III erhaltenen Wert ($n=38$) steht.

führten, führte jedoch immer nur zu Produkten, die große Ähnlichkeiten mit den oben erwähnten Mischpolymerisaten aufwiesen. Wie aus quantitativen Bestimmungen des Hydrolysates hervorging, lag auch hier wieder das Verhältnis Nitrophenylalanin : Aminophenylalanin bei zirka 1 : 1. Das Anhydrid, das zweifellos primär am Katalysator polymerisiert, scheint diesen mit einer Polymerenschicht zu umhüllen, wodurch die Hydrierung zum Stillstand kommt.

Versuche zur Darstellung des Poly-DL-Tyrosins.

Poly-Tyrosin ist bisher in der Literatur unseres Wissens nur einmal erwähnt¹², ohne daß jedoch nähere Angaben über Darstellung oder Eigenschaften vorliegen.

Das Poly-p-Aminophenylalanin IV schien uns zur Darstellung von Poly-Tyrosin, das von verschiedenen Standpunkten aus Interesse beansprucht, sehr geeignet.

Diazotieren der schwefelsauren Lösung von IV in gewohnter Weise, 2stündiges Rühren der Diazoniumsalzlösung unter Eiskühlung und anschließendes Erwärmen, wobei das in Säuren unlösliche „Poly-Tyrosin“ ausfällt, lieferte anfangs ein sehr dunkel gefärbtes Produkt, das jedoch nach Hydrolyse im Papierchromatogramm nur Tyrosin neben Spuren Amino-phenylalanin zeigte. Da die starke Färbung anscheinend auf Oxydationsvorgänge der Diazoniumlösung beim Erwärmen zurückzuführen war und außerdem Reaktion mit überschüssiger salpetriger Säure eingetreten sein konnte, haben wir die Diazoniumsalzlösung mit Harnstoff behandelt und dann im Stickstoffstrom bei 60 bis 70° verkocht. Das in einer Ausbeute von 86% erhaltene „Poly-Tyrosin“ war tatsächlich wesentlich heller, jedoch noch immer bräunlich gefärbt. Beim mehrtägigen Stehen an der Luft vertieft sich die Farbe zusehends. Oxydation durch den Luftsauerstoff zu melaninähnlichen Produkten dürfte eine mögliche Erklärung für diesen Vorgang sein. Das „Poly-Tyrosin“ ist in den wichtigsten Lösungsmitteln, unter anderen auch in Dimethylformamid, konz. Schwefelsäure und verd. und konz. Laugen, unlöslich. Mit letzteren tritt jedoch, vor allem beim Erwärmen, eine starke Rotfärbung der gequollenen Polymerenteilchen ein. Die Stickstoffanalysen, die für die Unterscheidung Poly-Amino-, Poly-Oxy- charakteristisch sind, zeigen den erwarteten Wert. Hydrolyse des Polymeren im Stickstoffstrom durch 24 Stdn. mit 5 n Schwefelsäure führte zu einem Hydrolysat, das die wichtigsten Tyrosinreaktionen zeigte und im Papierchromatogramm ausschließlich Tyrosin aufwies. Die quantitative stufenphotometrische Bestimmung des Tyrosins in diesem Hydrolysat

¹² W. T. Astbury, C. E. Dalglish, S. E. Darmon und G. B. B. M. Sutherland, *Nature* (London) **162**, 596 (1948).

unter Auswertung der *Millonschen* Farbreaktion nach *P. Bálint*¹³ bzw. *R. Brunner* und *M. Stepan*¹⁴ zeigte einen Tyrosingehalt von 70%. Auf Grund der angeführten Ergebnisse ist also unser „Poly-Tyrosin“ nicht einheitlich. Wir können aber gegenwärtig keine Angaben darüber machen, welche anderen Bausteine neben DL-Tyrosin am Aufbau dieses Produktes beteiligt sind. Vielleicht ist der Fehlbetrag von 30% auf die Bildung von Oxydationsprodukten bei der Diazotierung und Verkochung des Polyamins IV zurückzuführen.

Da unter den Bedingungen der Diazotierung kaum mit Sprengung von Peptidbindungen zu rechnen ist, dürfte dem „Poly-Tyrosin“ derselbe mittlere Polymerisationsgrad wie dem Poly-Aminophenylalanin zukommen, also zirka 30 bis 35.

Die R_F -Werte der verschiedenen, im Zuge dieser Arbeit dargestellten Aminosäuren und Peptide sind in der folgenden Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1.

Papier: *Schleicher-Schüll* 602, Butanol-Eisessig-Wasser (frisch bereitet, 4:1:5), absteigend, Dauer: 24 Stdn.

Verbindung	R_F -Wert
DL-p-Nitrophenylalanin	0,45
DL-p-Aminophenylalanin	0,107
DL-p-Amino-hexahydrophenylalanin	0,073
Dipeptid des p-Nitrophenylalanins	0,60
Dipeptid des p-Aminophenylalanins (roh) ...	0,04

Experimenteller Teil.

p-Nitrobenzyl-formylamino-malonsäure-diäthylester. 25,5 g Formylamino-malonester wurden in einer Natriumäthylatlösung [2,87 g (1 Mol) Na in 200 ml absol. Äthanol] gelöst, mit 23 g p-Nitro-benzylchlorid (1,1 Mol) in 120 ml absol. Äthanol versetzt und die Mischung 4 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Kühlen wurde abgesaugt und der Niederschlag durch Waschen mit Wasser vom NaCl befreit. Ausbeute: 34,5 g (82% d. Th.). Aus Äthanol Nadeln. Schmp. 192 bis 193°¹⁵.

$C_{15}H_{18}O_7N_2$. Ber. OC_2H_5 26,64. Gef. OC_2H_5 27,00.

DL-p-Nitro-phenylalanin (I). 26,5 g des subst. Malonesters wurden mit 250 ml konz. HCl 5 Stdn. zum Sieden erhitzt. Beim Kühlen kristallisierten aus der klaren Lösung 17,0 g Nitro-phenylalanin-chlorhydrat (88% d. Th.) aus. Dieses wurde in wenig heißem Wasser gelöst, unter Zusatz von Tierkohle filtriert und das Filtrat vorsichtig mit Ammoniak auf pH 7 gebracht. Ein Überschuß von NH_3 bewirkt starke Rotfärbung der Aminosäure. Nach

¹³ Biochem. Z. **299**, 133 (1938).

¹⁴ Österr. Chemiker-Ztg. **50**, 167 (1949).

¹⁵ Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunkts-apparat nach *Kofler* bestimmt.

dem Kühlen kristallisierten 11,7 g (71% d. Th., bezogen auf den Nitrobenzylformylamino-malonester) der gewünschten Aminosäure aus, die alle Eigenschaften des in der Literatur¹⁶ beschriebenen Produktes besaß. Aus Wasser farblose Nadeln. Schmp. 240 bis 245° (Zers.).

DL-p-Nitrophenylalanin-N-carbonsäureanhydrid (II). 6,8 g scharf getrocknetes I suspendierten wir in 80 ml absol. Tetrahydrofuran und leiteten unter Rühren bei 40° solange Phosgen ein, bis Lösung eingetreten war (zirka 1 Std.). Anschließend wurde im Vak. zur Trockne gedampft und der Rückstand aus Tetrahydrofuran-Petroläther umgelöst. Ausbeute: 7,2 g (94% d. Th.). Kleine Prismen. Schmp. 183 bis 184° (CO₂-Entwicklung). Die Schmelze erstarrt wieder. Das Anhydrid ist löslich in Tetrahydrofuran, Pyridin und Cyclohexanon, mäßig in Essigester, unlöslich in Petroläther. Es zeigt noch nach 24stünd. Stehen an Luft deutliche Anilinreaktion.

C₁₀H₈O₃N₂. Ber. C 50,86, H 3,41. Gef. C 51,50, H 3,47.

Polymerisation des Anhydrides II.

a) Durch trockenes Erhitzen: 0,6090 g frisch umgelöstes II wurden im Vak. von 1 Torr allmählich bis zum Schmp. erhitzt und anschließend noch 2 Stdn. bei 190° belassen. Der CO₂-Verlust betrug 0,1040 g, das sind 92% der theoretisch abspaltbaren Menge von 0,1135 g. Der braune Rückstand, der von den gebräuchlichsten Lösungsmitteln nur in Dimethylformamid löslich war, zeigte positive Pikrinsäurereaktion.

b) Mehrtägiges Erhitzen von II in absol. Cyclohexanon oder Tetrahydrofuran gab dunkelbraune, teils schmierige Massen, die nicht zu reinigen waren.

c) 5tägiges Behandeln von II mit überschüssigem absol. Pyridin bei Zimmertemp. gab eine schwach opaleszente Lösung, die nach dem Abdampfen des Lösungsmittels einen hellen Rückstand lieferte, der keine Anilinreaktion mehr zeigte und nach Hydrolyse und Papierchromatographie als Poly-Nitrophenylalanin anzusprechen ist.

d) *Poly-DL-p-Nitrophenylalanin (III)*. 6,5 g frisch umgelöstes und gut getrocknetes II wurden in 350 ml frisch dest., absol. Nitrobenzol gelöst, mit zirka 50 mg niedriger Polymerer versetzt und 10 Tage im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Versetzen mit 350 ml Äther und 600 ml Petroläther, wobei der ursprünglich vorhandene Niederschlag sich nicht wesentlich vermehrte, haben wir abgesaugt und mit Äthanol und Äther gewaschen. Ausbeute: 3,6 g (68% d. Th.) sehr helles Pulver, das sich ab 300° verfärbt und von 340 bis 345° u. stark. Zers. schmilzt.

Zur Reinigung wurde je 5 Min. mit je 50 ml absol. Essigester und Äthanol ausgekocht und die Mutterlaugen mit der Nitrobenzol-mutterlauge vereinigt. 4 Tage mit Äther im Apparat extrahiert: 3,40 g.

Leicht löslich in Dimethylformamid, in den gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich. Pikrinsäure- und Ninhydrinreaktion negativ.

(C₉H₈O₃N₂)₃₈ · H₂O. MG = 7320,45. Ber. C 56,11, H 4,21, N_{NH₂} 0,191.

Gef. C 55,94, H 4,14, N_{NH₂} 0,192.

Zur *Hydrolyse* haben wir 50 mg III mit 10 ml konz. HCl 9 Stdn. im Rohr auf 150 bis 160° erhitzt. Die klare Lösung wurde zur spektrophotometrischen Bestimmung des p-Nitrophenylalanins verwendet, wobei 95% d. Th. gefunden

¹⁶ E. Erlenmeyer und A. Lipp, Liebigs Ann. Chem. **219**, 213 (1883). — Siehe auch Th. Curtius und W. Mühlhäuser, loc. cit.

wurden. Die Bestimmung des Amino-Stickstoffs nach *van Slyke* ergab 97% der berechneten Menge (3,54 mg im Gesamthydrolysat statt 3,65 mg). Im Papierchromatogramm war ausschließlich p-Nitrophenylalanin festzustellen.

Niedrige Polymere (n = 11). Die Nitrobenzolzuckerlauge von III ergab beim Eindampfen 1,0 g niedrige Polymere in Form eines bräunlichen Pulvers, das von 175 bis 180° sinterte und bei 220 bis 230° u. Zers. schmolz. Pikrinsäure- und Ninhydrinreaktion waren schwach positiv, Löslichkeitseigenschaften ähnlich dem Polymeren III.

Bestimmung des Amino-Stickstoffs ergab 0,646%, was einem Molgewicht von zirka 2170 und einem n von zirka 11 entspricht.

DL-p-Nitrophenylalanin-äthylester. 3,1 g I haben wir in 50 ml absol. Äthanol mit HCl-Gas gesättigt und 1½ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Der Abdampfdruckstand lieferte 4,0 g (98% d. Th.) Esterchlorhydrat, das, aus Äthanol-Äther umgelöst, von 177 bis 178° (Zers.) schmolz.

$C_{11}H_{14}O_4N_2 \cdot HCl$. Ber. Cl 12,91. Gef. Cl 13,16.

Aus 3,8 g Chlorhydrat wurde der Ester in üblicher Weise mit Kaliumkarbonat unter Äther in Freiheit gesetzt. Er stellte ein gelbes Öl dar, das bei 0,5 Torr von 165 bis 168° (Luftbadtemp.) überging. Ausbeute: 3,0 g (92% d. Th.).

Azlakton des DL-p-Nitrophenylalanins (VII). Dazu wurden 3 g I mit 40 ml Essigsäureanhydrid im siedenden Wasserbad so lange erhitzt, bis Lösung eingetreten war (zirka 20 bis 25 Min.). Nach Abdampfen des überschüssigen Lösungsmittels hinterblieben 3,3 g (100% d. Th.) Azlakton als zähes gelbes Öl, das sich beim Versuch einer Destillation im Hochvak. zersetzte. Auch beim längeren Stehen oder Erhitzen im sied. Wasserbad verharzten beträchtliche Mengen. Es wurde daher roh weiterverarbeitet.

N-Acetyl-DL-p-nitrophenylalanyl-DL-p-nitrophenylalanin-äthylester (VIII). Bei der Vereinigung einer Lösung von 3 g Ester in 30 ml absol. Äther und 3 g Azlakton VII (1 Mol) in 15 ml absol. Tetrahydrofuran fielen nach einigen Min. 4,1 g (69% d. Th.) des N-Acetyl-dipeptid-esters aus. Aus Äthanol mikrokrist. Nadeln. Schmp. 224 bis 226°.

$C_{22}H_{24}O_8N_4$. Ber. C 55,93, H 5,12. Gef. C 55,84, H 5,08.

N-Acetyl-DL-p-nitrophenylalanyl-DL-p-nitrophenylalanin (IX). 0,25 g VIII wurden in 10 ml Äthanol suspendiert und mit 2 ml 2 n NaOH 1½ Stdn. geschüttelt, wobei nach ½ Std. Lösung eingetreten war. Nach dem Ansäuern und Abdampfen des überschüssigen Äthanol im Vak. erhielten wir 0,2 g (83% d. Th.) eines Produktes, das nach Umlösen aus Äthanol-Wasser von 120 bis 130° schmolz, wieder erstarrte, um dann von 205 bis 210° (Zers.) zu schmelzen. Es handelte sich wahrscheinlich um ein Hydrat.

$C_{20}H_{20}O_8N_4 \cdot H_2O$. Ber. Äqu.-Gew. 462. Gef. Äqu.-Gew. 457.

DL-p-Nitrophenylalanyl-DL-p-nitrophenylalanin (VI). 2,5 g VIII erhitzen wir mit 200 ml 3 n HBr 40 Min. zum Sieden; dabei ging fast alles in Lösung. Es wurde filtriert und das Filtrat im Vak. zur Trockne gedampft, der pulvrige Rückstand in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle erhitzt, filtriert und das Filtrat vorsichtig mit Ammoniak neutralisiert. Es tritt bald Kristallisation ein. Nach einmaligem Auskochen mit wenig Wasser wog der Niederschlag, der laut Papierchromatogramm frei von I war, 0,67 g (30% d. Th.).

Zur Reinigung wurde 2mal aus viel heißem Wasser umgelöst. Schmp. 150 bis 160°, erstarrt wieder völlig, um dann bei 323 bis 325° (Zers.) zu schmelzen.

Auch nach extremen Trocknungsbedingungen ändern sich diese Verhältnisse nicht.

$C_{18}H_{18}O_7N_4 \cdot H_2O$. Ber. C 51,43, H 4,79, Gef. C 51,00, H 4,72.

Äqu.-Gew. 420. Äqu.-Gew. 425 (Willstätter).

DL-p-Nitrophenylalanyl-DL-p-nitrophenylalanyl-äthylesterchlorhydrat. 80 mg VI wurden in 8 ml absol. Äthanol unter Kühlung mit HCl-Gas gesättigt, hierauf noch einige Min. am sied. Wasserbad erwärmt und im Vak. abgedampft. Der Rückstand wurde noch einmal derselben Behandlung unterworfen. Aus Äthanol-Äther Schmp. 123 bis 124°.

$C_{20}H_{22}O_7N_4 \cdot HCl$. Ber. Cl 7,59, OC_2H_5 9,65. Gef. Cl 7,60, OC_2H_5 9,54.

VI durch Umsetzung des Anhydrides II mit *p*-Nitrophenylalanin, 0,3 g I wurden mit der äquival. Menge äthanol. NaOH in das Na-Salz umgewandelt und dieses, in 7 ml Wasser gelöst, mit einer Lösung von 0,35 g II (1 Mol) in 20 ml Essigester 4 Stdn. geschüttelt. Die Emulsion brachten wir im Vak. zur Trockne, dampften 2mal mit verd. Essigsäure ab und lösten den Rückstand aus viel Wasser unter Zusatz von Tierkohle 2mal um. Ausbeute: 0,15 g (25% d. Th.) an Dipeptid-hydrat von den angegebenen Eigenschaften.

DL-p-Aminophenylalanyl-DL-p-aminophenylalanin. 0,4 g VI hatten in einer Lösung von 2,9 ml 1 n HCl (3 Mol), 10 ml Wasser und 10 ml Äthanol unter Verwendung von Pd-Kohle (10%) als Katalysator nach 1 $\frac{3}{4}$ Stdn. 134,5 ccm Wasserstoff aufgenommen. Ber. für 6 Mol: 138 ccm ($t = 17^\circ$, $p = 748$ mm). Nach dem Filtrieren und Eindampfen des Filtrats verblieben 0,42 g hygroskopisches Chlorhydrat, das nach Hydrolyse im Papierchromatogramm ausschließlich *p*-Aminophenylalanin zeigte. Es gelang nicht, aus dem Chlorhydrat das freie Peptid mit Ammoniak oder Silberkarbonat rein zu erhalten.

Zur Charakterisierung wurde ein Teil, wie für das Dipeptid VI beschrieben, verestert. Das Esterchlorhydrat war eine amorphe, schwach hygroskopische Substanz.

$C_{20}H_{26}O_3N_4 \cdot 3 HCl$. Ber. OC_2H_5 9,38. Gef. OC_2H_5 9,12.

Tri-DNP-p-Aminophenylalanin-dipeptid. 0,2 g des bei der Hydrierung erhaltenen rohen Chlorhydrats wurden in 6 ml Wasser gelöst, mit 0,35 g $NaHCO_3$ versetzt und mit einer Lösung von 0,40 g DNFB (5 Mol) in 15 ml Äthanol 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. geschüttelt. Nach dem Abdampfen überschüssigen Alkohols im Vak. schüttelten wir 3mal zur Entfernung von DNFB mit Äther aus und säuerten an, wobei wir 0,3 g (79% d. Th.) eines orangegelben Niederschlages erhielten.

Zur Reinigung wurde in Aceton gelöst und mit Äther-Petroläther gefällt. Schmp. 165 bis 169° (Zers.).

$C_{36}H_{28}O_{15}N_{10}$. Ber. N 16,66. Gef. N 16,57.

Mischpolymeres aus p-Nitrophenylalanin und p-Aminophenylalanin. 0,43 g III wurden in 30 ml Dimethylformamid mit Raney-Nickel 4 Tage unter geringem Wasserstoffüberdruck bei Zimmertemp. geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. verblieben 0,31 g rotbraunes Glas, das sich nach scharfem Trocknen pulvern ließ und dessen Löslichkeitseigenschaften ähnlich denen von III waren.

Ein Teil davon wurde durch 24stünd. Kochen mit HCl (1 : 1) hydrolysiert und im Hydrolysat, das papierchromatographisch neben I zirka gleiche Teile

p-Aminophenylalanin zeigte, die Menge des p-Nitrophenylalanins spektrophotometrisch zu 47% bestimmt.

Beim Auskochen des rohen Hydrierungsproduktes mit viel Methanol gingen zirka 0,05 g in Lösung, die aus dem Filtrat mit Äther gefällt werden konnten und nach dem Abzentrifugieren bei längerem Stehen an der Luft tiefrote Färbung annahmen. In Salzsäure trat mit Zink rasch wieder Entfärbung ein.

Poly-DL-p-Aminophenylalanin (IV). 1,40 g III haben wir in 60 ml Dimethylformamid gelöst, mit Raney-Nickel versetzt und bei einem Anfangsdruck von 70 Atm. Wasserstoff und einer Temp. von 100 bis 110° 24 Stdn. geschüttelt. Nach dem Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. bis auf zirka 10 ml wurde mit 50 ml Äthanol gefällt, abgesaugt und gut mit Äthanol und Äther gewaschen. Zur Reinigung wurde wieder in Dimethylformamid gelöst und erneut gefällt. Ausbeute: 1,0 g (85% d. Th.) hellbraunes Pulver, das in den im allgem. Teil erwähnten Lösungsmitteln löslich bzw. unlöslich ist und sich ab 200° allmählich verfärbt und zersetzt. Es zeigte keine Ninhydrin- und Pikrinsäurereaktion.

$(C_9H_{10}ON_2)_n \cdot H_2O$ ($n = 30$ bis 35). Ber. C 66,40, H 6,19, N 17,21.

Gef. C 62,28, H 6,11, N 16,03.

Hydrolyse von IV und Bestimmung von p-Aminophenylalanin im Hydrolysats. Die Hydrolyse erfolgte durch 24stünd. Erhitzen mit konz. HCl.

a) Das Hydrolysats zeigte im Papierechromatogramm ausschließlich p-Aminophenylalanin.

b) Bei der quantitativen spektrophotometrischen Bestimmung wurden 101,5% der theoretisch möglichen Menge p-Aminophenylalanin gefunden.

c) Nach Abdampfen des Hydrolysates im Vak. und Isolierung des p-Aminophenylalanins aus dem Chlorhydrat mit Ammoniak nach Erlenmeyer¹⁶ erhielten wir 30% dieser Aminosäure, die in allen Eigenschaften mit einem synthetischen Präparat identisch war. Wegen der leichten Löslichkeit ist die Isolierung von p-Aminophenylalanin, besonders in kleineren Mengen, mit Verlusten verbunden.

d) Aus dem Hydrolysats haben wir in der weiter unten beschriebenen Weise durch Umsetzung mit Phenylisocyanat 56% d. Th. der Harnstoffverbindung X gewinnen können, die im Mischschmp. keine Depression mit einer authentischen Probe gab.

e) In der gleichen Weise wurden 60% d. Th. Di-DNP-p-Aminophenylalanin aus dem Hydrolysats gewonnen, das ebenfalls in allen Eigenschaften mit einer synthetischen Probe übereinstimmte.

Di-Phenylisocyanat-DL-p-aminophenylalanin (X). 0,3 g Aminophenylalanin wurden in 3,5 ml 0,5 n NaOH (1,05 Mol) gelöst und unter Eiskühlung mit 0,5 g (2,6 Mol) Phenylisocyanat 30 Min. geschüttelt, wobei durch Laugezusatz ein pH von zirka 8 aufrechterhalten wurde. Schon nach einigen Min. hatte sich ein dichter Niederschlag abgeschieden, der aus dem schwerlöslichen Natriumsalz bestand. Nach dem Ansäuern wurde abgesaugt. Ausbeute: 0,7 g (100% d. Th.). Aus Äthanol-Wasser Blättchen. Schmp. 231 bis 233° (Zers.).

$C_{23}H_{22}O_4N_4$. Ber. C 66,02, H 5,30. Gef. C 66,34, H 5,18.

Äqu.-Gew. 418,

Äqu.-Gew. 417.

5-(p-Phenylureido-benzyl)-3-phenyl-hydantoin (XI). Die Phenylisocyanatverbindung X wandelt sich beim Erhitzen mit viel konz. HCl in das Hydantoin

XI um, ohne daß Lösung eintritt. So konnten aus 0,08 g X durch Erhitzen mit 10 ml konz. HCl 0,05 g (66% d. Th.) XI erhalten werden, die abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen wurden. Aus Äthanol Nadeln. Schmp. 323 bis 325° (Zers.); wurde langsam aufgeheizt, schmolz ein Teil bei 260°, um dann wieder zu erstarren und mit der Hauptmenge von 323 bis 325° zu schmelzen.

$C_{23}H_{20}O_3N_4$. Ber. N 13,96. Gef. N 13,71.

Aus dem Hydantoin konnte beim Erwärmen mit überschüssiger 1 n NaOH bis zur Lösung und anschließendem Ansäuern wieder X erhalten werden.

Di-DNP-DL-p-Aminophenylalanin. Dieses wurde analog, wie beim p-Aminophenylalanin-dipeptid beschrieben, in 68%iger Ausbeute erhalten. Zur Reinigung wurde es in wäßr. Soda gelöst und mit verd. HCl wieder gefällt. Schwer löslich in Äthanol, unlöslich in Wasser. Schmp.: 125–131° (Zers.).

$C_{21}H_{16}O_{10}N_6$. Ber. N 16,40, Äqu.-Gew. 512. Gef. N 16,50, Äqu.-Gew. 518.

Phenylisocyanat-DL-p-nitrophenylalanin. Dieses konnte analog dem p-Aminophenylalaninderivat in 95%iger Ausbeute gewonnen werden. Aus Äthanol-Wasser Nadeln. Schmp. 172 bis 173° (Zers.).

5-(p-Nitrobenzyl)-3-phenylhydantoin. 0,25 g obigen Produktes gingen beim Erhitzen mit 30 ml konz. HCl in Lösung. Nach 1 Std. wurde gekühlt und abgesaugt. Ausbeute: 0,2 g (85% d. Th.). Aus Äthanol Prismen. Schmp. 195 bis 198°.

$C_{16}H_{13}O_4N_3$. Ber. C 61,78, H 4,21. Gef. C 62,01, H 4,23.

N-DNP-DL-p-Nitrophenylalanin. Es wurde in der bereits beschriebenen Weise aus p-Nitrophenylalanin und DNFB gewonnen. Ausbeute: 89% d. Th. Aus Äthanol Blättchen. Schmp. 206 bis 208°. In frisch umgelöstem Zustand schmilzt die Verbindung von 105 bis 115°, erstarrt wieder, um dann den angegebenen Schmp. zu zeigen. Nach Trocknen im Hochvak. bei 100° über P_2O_5 war nur mehr der hohe Schmp. festzustellen.

$C_{15}H_{12}O_8N_4$. Ber. Äqu.-Gew. 376. Gef. Äqu.-Gew. 375.

DL-p-Amino-hexahydro-phenylalanin. 1,05 g p-Nitrophenylalanin wurden mit 0,3 g PtO_2 in 20 ml 5%iger HCl hydriert. Nach 17 Stdn. war die ber. Menge Wasserstoff (6 Mol) aufgenommen. Der Abdampfrückstand der vom Katalysator filtrierten Lösung lieferte 1,1 g (85% d. Th.) pulveriges, hygroskopisches Chlorhydrat, das glatt löslich in Äthanol und unlöslich in Chloroform war. Aus dem Chlorhydrat wurde die Aminosäure mit Ag-Karbonat in Freiheit gesetzt. Dabei erhielten wir 88% d. Th. eines Pulvers, das schwach hygroskopisch war. Es war in Aceton, Äthanol, Dioxan unlöslich, leicht löslich dagegen in Wasser und zersetzte sich von 145 bis 160°. Die Aminosäure ließ sich nicht zur Kristallisation bringen.

$C_9H_{18}O_2N_2$. Ber. Äqu.-Gew. 186. Gef. Äqu.-Gew. 192 (nach Willstätter).

DL-p-Amino-hexahydro-phenylalanin-äthylester. Dieser wurde in üblicher Weise mit äthanol. HCl aus dem oben erwähnten, rohen Chlorhydrat gewonnen. Ausbeute: 69% d. Th. farbloses Öl. Sdp._{0,005}: 100 bis 110° (Luftbadtemp.). Auch der Ester ist ganz schwach hygroskopisch.

$C_{11}H_{22}O_2N_2$. Ber. N 13,07. Gef. N 12,71.

Di-Phenylisocyanat-DL-p-amino-hexahydro-phenylalanin. 0,120 g des rohen Chlorhydrats der Aminosäure wurden in der bereits beschriebenen Weise mit Phenylisocyanat umgesetzt. Ausbeute: 0,18 g (91% d. Th.). Leicht löslich in warmem Äthanol, schwer löslich in H_2O . Aus Äthanol-Wasser Körnchen. Schmp. 219 bis 220° (Zers.).

$C_{23}H_{28}O_4N_4$. Ber. C 65,08, H 6,64. Gef. C 64,98, H 6,68.

Di-DNP-DL-p-Amino-hexahydro-phenylalanin. Umsetzung von 0,28 g Amino-hexahydrophenylalanin-chlorhydrat mit 0,8 g (4 Mol) DNFB in gewohnter Weise gab 0,35 g (62% d. Th.) der hellgelben DNP-Verbindung. Aus Aceton-Wasser Blättchen. Schmp. 239 bis 241° (Zers.).

$C_{21}H_{22}O_{10}N_6$. Ber. N 16,21. Gef. N 16,27.

Poly-DL-p-Amino-phenylalanin-chlorhydrat. 0,05 g IV lösten wir in wenig 2 n HCl, filtrierten und dampften im Vak. bei tiefer Temp. zur Trockne. Nach mehrmaligem Abdampfen mit Alkohol wurde der vorher glasige Rückstand fest. Zur Reinigung wurde er mit Äthanol abgesaugt und mit Äther gewaschen. Hellbraunes Pulver, leicht löslich in Wasser, das sich ab 250° verfärbt, ohne bis 340° zu schmelzen.

$(C_9H_{10}ON_2 \cdot HCl)_n \cdot H_2O \cdot HCl$. Ber. für $n = 30$ Cl 18,28. Gef. Cl 15,70.

Poly-Phenylisocyanat-DL-p-aminophenylalanin (XII). 0,096 g IV wurden in 15 ml Pyridin und 8 ml Wasser gelöst und mit 1,5 g Phenylisocyanat 20 Min. unter Eiskühlung und hierauf noch 3 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Es hatte sich ein dichter Niederschlag abgeschieden, der mit verd. HCl und Wasser gut gewaschen wurde. Beim oftmaligen Auskochen mit Äthanol geht die Hauptmenge in Lösung. Aus Äthanol Nadeln. Schmp. 241 bis 243°. Es handelt sich wahrscheinlich um ein Umsetzungsprodukt des Phenylisocyanats, das jedoch nicht näher untersucht wurde. Der Rückstand wog 0,156 g (93% d. Th.). Hellbraunes Pulver, das sich ab 310° verfärbt, ohne zu schmelzen. Zur Reinigung wurde 3 Tage mit Äther extrahiert.

$(C_{18}H_{18}O_2N_3)_n \cdot C_7H_7O_2N$. Ber. für $n = 30$ N 14,86. Gef. N 13,59.

Poly-DNP-DL-p-Aminophenylalanin (XIII). Aus 0,10 g IV wurde in der beschriebenen Weise das Chlorhydrat dargestellt, dieses in 10 ml Wasser gelöst, mit 2 g DNFB in 25 ml Äthanol versetzt und unter Schütteln im Laufe einer halben Std. die Lösung von 1 g $NaHCO_3$ in 15 ml Wasser zuge tropft. Anschließend haben wir noch 15 Stdn. geschüttelt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und erschöpfend mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und hierauf noch 2 Tage mit Äther extrahiert. Ausbeute: 0,20 g (98% d. Th.) rotbraunes Pulver, das in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln, bis auf konz. Schwefelsäure, unlöslich ist.

$(C_{15}H_{12}O_5N_4)_n \cdot C_6H_4O_5N_2$. Ber. N 17,04. Gef. N 16,73.

Versuche zur Bestimmung der Molgröße des Poly-Amino-phenylalanins IV.

a) *Durch Dialyse.* 28,64 mg IV, gelöst in 7 ml Pyridin + 5 ml Wasser wurden 4 Tage bei Zimmertemp. gegen eine Mischung von 28 ml Pyridin und 20 ml Wasser durch einen Cellophanschlauch (mit einer mittleren Porenweite von 20 Å) dialysiert. Darnach waren 5,2 mg (18%) des Polymeren in der Außenlösung zu finden.

b) *Durch Veresterung. 1. Mit äthanol. HCl.* 0,10 g IV wurden mit 25 ml absol. Äthanol übergossen und unter Kühlung mit HCl-Gas gesättigt. Anschließend haben wir 5 Min. am siedenden Wasserbad erhitzt, im Vak. ab-

gedampft, erneut, wie beschrieben, verestert und nun 3 Stdn. bei Zimmertemp. stehengelassen. Es war keine Lösung eingetreten. Der bräunliche Abdampfdruckstand wurde in Wasser gelöst und mit ges. Bikarbonatlösung gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde mit Wasser und Aceton gewaschen.

Für Molgew. 6250 ($n = 38$ bis 39) ber. OC_2H_5 0,720.

Gef. OC_2H_5 0,720.

2. Mit methanol. HCl. Es wurde auf die gleiche Weise, wie beschrieben, nur diesmal 24 Stdn., bei Zimmertemp. verestert und aufgearbeitet.

Für Molgew. 4040 ($n = 25$) ber. OCH_3 0,765.

Gef. OCH_3 0,765.

Hydrierung des N-Carbonsäureanhydrids II. 0,4 g II haben wir unter Zusatz von Raney-Nickel in 70 ml absol. Essigester 24 Stdn. bei 80 bis 100° und 70 Atm. Wasserstoffdruck geschüttelt. Während die Essigesterlösung nach dem Filtrieren und Abdampfen nur 0,07 g rotbraunen öligen Rückstand lieferte, erhielten wir aus dem Katalysator nach Auskochen mit Dimethylformamid 0,180 g eines Films, der sich pulvern ließ und dieselben Eigenschaften wie die oben erwähnten Mischpolymeren aufwies.

„Poly-DL-Tyrosin“ (V). 0,100 g IV wurden in 12 ml 2 n H_2SO_4 gelöst, filtriert, und unter Eiskühlung und Rühren mit einer Lösung von 0,070 g NaNO_2 in 3 ml Wasser allmählich versetzt. Anschließend wurde noch 2 Stdn. unter Eiskühlung gerührt, hierauf unter Durchleiten von N_2 so lange eine 3%ige Harnstofflösung zugegeben, bis KJ-Stärkepapier nicht mehr gebläut wurde und dann allmählich auf 60 bis 70° unter weiterem Durchleiten von N_2 erwärmt. Nach einigen Min. begann sich die Lösung zu trüben und bald darauf einen Niederschlag abzuscheiden, der nach weiteren 10 Min. abgesaugt und gut mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen wurde. Ausbeute: 0,086 g (86% d. Th.) braunes Pulver, das sich bis 350° nur verfärbt, ohne zu schmelzen. Es ist in den üblichen Lösungsmitteln, auch in Lauge und in konz. Schwefelsäure unlöslich. Verfärbt sich nach längerem Stehen an der Luft nach Dunkelbraun. Zur Reinigung wurde 2 Tage mit Äther extrahiert.

$(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{N})_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($n = 30$). Ber. N 8,55. Gef. N 8,70.

Hydrolyse von V. 0,021 g V wurden unter Durchleiten von N_2 mit 5 ml 5 n H_2SO_4 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Die klare, helle Lösung, die im Papierchromatogramm nur Tyrosin aufwies, wurde zur stufenphotometrischen Bestimmung des Tyrosins verwendet. Dabei wurden 0,0147 g (70% des Polymeren bzw. 63% d. Th.) an Tyrosin gefunden.

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer bestimmt.

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

Zusammenfassung.

1. Die Polymerisation von DL-p-Nitrophenylalanin-N-carbonsäureanhydrid liefert neben niedrigen Polymeren ein Poly-DL-p-Nitrophenylalanin vom mittleren Polymerisationsgrad $n = 38$, das ausschließlich aus p-Nitrophenylalanin aufgebaut ist.

2. Hydrierung dieses Polymeren ergab ein Poly-DL-p-Aminophenylalanin, dessen Struktur gesichert werden konnte und über dessen Molekülgröße Untersuchungen angestellt wurden, die einen Wert für $n = 30$ bis 35 wahrscheinlich machten.

3. Durch Diazotierung des Poly-Aminophenylalanins konnte ein „Poly-DL-Tyrosin“ erhalten werden, das nicht einheitlich ist und aus durchschnittlich 70% Tyrosinresten aufgebaut ist.

4. Verschiedene Derivate des p-Nitro-, p-Amino- und des p-Amino-hexahydrophenylalanins sowie Dipeptide der beiden ersten Aminosäuren werden beschrieben.