

344. Emil Abderhalden: Weiterer Beitrag zur Kenntnis von *l*-Tryptophan enthaltenden Polypeptiden.

(3. Mitteilung¹⁾.)

[Aus dem Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Berlin.]

(Eingegangen am 10. Juni 1909.)

Bei der partiellen Hydrolyse von Edestin aus Baumwollsaamen ist ein Produkt isoliert worden, das bei der totalen Hydrolyse die Aminosäuren Tryptophan, Glutaminsäure und Leucin gab²⁾. Die Molekulargewichtsbestimmung und die Elementaranalyse ergaben Werte, die auf ein aus den drei genannten Aminosäuren bestehendes Tripeptid hinweisen. Auch die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Aminosäuren bei der totalen Hydrolyse erhalten wurden, stehen mit einer solchen Annahme in Einklang. Das isolierte Produkt ließ sich durch bestimmte Reaktionen gegenüber anderen, gleichzeitig erhaltenen ziemlich gut charakterisieren, und durch Fällungsreaktionen konnten manche Beimengungen entfernt werden. Da das isolierte Produkt jedoch allen Bemühungen zum Trotz nicht in Kristallform zu bringen war, und vorläufig auch der Versuch, aus dem vermutlichen Tripeptid durch weitere partielle Hydrolyse ein einheitliches Dipeptid zu gewinnen, fehl schlug, so blieb als einziger Weg, um die gewonnene Substanz zu identifizieren, der Versuch übrig, sie mit synthetisch dargestellten, aus den Aminosäuren Tryptophan, Glutaminsäure und Leucin bestehenden Tripeptiden zu vergleichen. Wir haben vorläufig von den möglichen Kombinationen eine dargestellt, nämlich *l*-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure. Diese Verbindung zeigt nun manche Eigenschaften, die mit der durch partielle Hydrolyse aus Edestin dargestellten völlig übereinstimmen. Nur in folgenden Punkten ergaben sich Unterschiede: Während das analytisch gewonnene Produkt mit wäßriger Tanninlösung einen dichten, im Überschuß des Fällungsmittels unlöslichen Niederschlag gibt, zeigt die wäßrige Lösung des synthetisch dargestellten Tripeptids keine Fällung. Während ferner das analytisch gewonnene Präparat sich in kaltem Wasser leicht löst, ist das synthetisch gewonnene Tripeptid schwer löslich. Dieser letztere Unterschied dürfte ohne Zweifel

¹⁾ Vergl. Emil Abderhalden und Martin Kempe: Synthese von Polypeptiden, XX. Mitt. Derivate des Tryptophans, diese Berichte **40**, 2737 [1907]; Emil Abderhalden und Louis Baumann, Weiterer Beitrag zur Kenntnis von *l*-Tryptophan enthaltenden Polypeptiden, ebenda **41**, 2857 [1908].

²⁾ Emil Abderhalden: Partielle Hydrolyse einiger Proteine. Ztschr. f. physiol. Chem. **58**, 386 [1909].

darauf beruhen, daß das letztere Präparat in Krystallform vorlag und das erstere nur in amorphem Zustand. Solange das durch Synthese gewonnene Tripeptid amorph war, löste es sich auch viel leichter in Wasser als die krystallisierte Substanz. Im Drehungsvermögen beider Präparate sind Unterschiede erkennbar, die nicht ohne weiteres durch die Annahme, daß das auf analytischem Wege gewonnene Präparat bei der Darstellung racemisiert worden ist, zu erklären sind. Das durch Synthese erhaltene Präparat zeigt $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17.4^{\circ}$, das durch partielle Hydrolyse erhaltene $+8.2^{\circ}$.

Es ist somit nicht gelungen, das durch stufenweisen Abbau aus Edestin erhaltene Präparat mit dem Tripeptid *l*-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure zu identifizieren. Es ist möglich, daß das analytisch gewonnene Präparat gar nicht einheitlich ist, es ist jedoch auch denkbar, daß die genannten drei Aminosäuren in anderer Reihenfolge sich folgen. Unsere Aufgabe wird es sein, auch die übrigen, noch möglichen Kombinationen durch Synthese zu gewinnen.

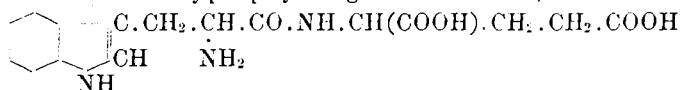
Bei der partiellen Hydrolyse des Edestins war ferner ein Körper isoliert worden, der nur zwei Aminosäuren enthält, nämlich Tryptophan und Glutaminsäure. Alle Befunde — Molekulargewichtsbestimmung, Elementaranalyse, totale Hydrolyse — stimmen sehr gut auf ein aus den genannten Aminosäuren bestehendes Dipeptid. Es kamen die beiden Kombinationen *d*-Glutaminyl-*l*-tryptophan und *l*-Tryptophyl-*d*-glutaminsäure in Betracht. Die letztere haben wir dargestellt und mit dem aus Glutaminsäure und Tryptophan bestehenden Produkt verglichen. In vielen Beziehungen besteht eine große Ähnlichkeit in den Eigenschaften beider Präparate. Die Unterschiede im Zersetzungspunkt und im Drehungsvermögen machen es jedoch auch hier sehr wahrscheinlich, daß die beim partiellen Abbau von Edestin gewonnene Substanz nicht ganz einheitlich ist. Das synthetisch gewonnene Dipeptid sintert gegen 170° und ist bei 173° geschmolzen. Es zeigt $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +34.35^{\circ}$. Die entsprechenden Werte für das durch Abbau erhaltene Präparat sind: Sintern gegen 150° und Zersetzung bei 162° ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19.8^{\circ}$. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß ein Gemisch von Isomeren vorlag, ausgeschlossen sind jedoch auch andere Verunreinigungen nicht. Alle diese Beobachtungen zeigen, mit welcher großen, fast unübersteiglichen Schwierigkeiten einstweilen noch die Gewinnung von Produkten aus Eiweiß, die mehr als eine Aminosäure gebunden enthalten, verknüpft ist. Den Hauptgrund der unsicheren Resultate bildet die Schwierigkeit, zu krystallisierten Präparaten zu gelangen. Unsere Erfahrungen lassen den Wunsch als gerechtfertigt erscheinen, es möchten in Zukunft nur dann Abbauprodukte aus Pro-

teinen als Polypeptide bezeichnet werden, wenn es geglückt ist, sie mit bestimmten, synthetisch dargestellten Polypeptiden vollständig zu identifizieren. Die leider verbreitete Gewohnheit, zusammengesetzte Abbauprodukte aus Eiweiß ohne jede Identifizierung kurzer Hand als Polypeptide zu bezeichnen, muß zu unrichtigen Vorstellungen führen.

Die Darstellung des Tripeptids: *l*-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure versuchten wir auf zwei Arten: Einmal gingen wir von dem schon bekannten Dipeptid *l*-Leucyl-*l*-tryptophan aus. Dieses verwandelten wir in das Chlorid und kuppelten es in bekannter Weise mit *d*-Glutaminsäure. Das so erhaltene Präparat war amorph und konnte nicht in die Kristallform übergeführt werden. Es löste sich spielend in Wasser. Seine Menge war zu gering, um es genauer zu identifizieren. Einen besseren Erfolg ergab das folgende Verfahren: Wir stellten zunächst das bisher noch unbekannte Dipeptid *l*-Tryptophyl-*d*-glutaminsäure aus *l*-Tryptophylchlorid und *d*-Glutaminsäure dar. Diese Verbindung kuppelten wir mit *d*-Brom-isocapronylchlorid, und führten dann den entstandenen Bromkörper in gewohnter Weise durch Einwirkung von wäßrigem Ammoniak in das Tripeptid *l*-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure über. Das so erhaltene Tripeptid war zunächst amorph, kristallisierte jedoch bald.

Erwähnt sei noch, daß die zu diesen Versuchen verwendete *d*-Glutaminsäure durch Hydrolyse von Gliadin mit rauchender Salzsäure erhalten worden war. Das *l*-Tryptophan gewannen wir durch Verdauung von Casein mit Pankreatin. Die Darstellung des *l*-Tryptophans vereinfachten wir dadurch, daß wir die Quecksilbersulfatfällung nicht mit Schwefelwasserstoff zerlegten und dann die Schwefelsäure mit Baryt entfernten, sondern direkt Bariumsulfid eintrugen. Die Ausbeuten an *l*-Tryptophan betragen durchschnittlich 0.75—0.85 %.

l-Tryptophyl-*d*-glutaminsäure.



7.2 g *l*-Tryptophan wurden mit 10 g Phosphorpentachlorid und 85 ccm Acetylchlorid behandelt. Das entstandene salzsaure Tryptophylchlorid wurde unter Kühlung durch Eis mit 15 g Glutaminsäurediäthylester, der in 60 ccm Chloroform gelöst war, gekuppelt. Die filtrierte Lösung hinterließ beim Eindampfen einen Sirup. Er wurde mit 150 ccm 2-*n*. Natronlauge etwa $\frac{3}{4}$ Stunden geschüttelt, die alkalische Lösung filtriert und mit 60 ccm 5-*n*. Schwefelsäure neutralisiert. Um das Kupplungsprodukt zu reinigen, wurde die Lösung mit

so viel verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis sie fünf Volumenprozent davon enthielt und dann mit überschüssiger 10-prozentiger Quecksilbersulfatlösung gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, dann in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Lösung befreiten wir zunächst durch Einleiten von Koblenensäure von Schwefelwasserstoff, fällten die Schwefelsäure mit Baryt und engten dann die Lösung unter vermindertem Druck unter Zusatz von Alkohol ein. Aus der konzentrierten Lösung schied sich das Dipeptid zunächst amorph aus. Ausbeute 7.0 g. Das Dipeptid läßt sich durch Auflösen in Wasser nach Alkoholzusatz und vorsichtigem Eindunsten in Form feiner Nadelchen gewinnen. Es fängt gegen 170° an zu sintern und schmilzt bei 173° (korr.) unter Aufblähen.

Zur Analyse wurde bei 80° getrocknet.

0.1823 g Subst.: 0.3837 g CO_2 , 0.1005 g H_2O . — 0.1976 g Subst., nach Kjeldahl verbrannt, erforderten 17.46 ccm $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure.

$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$ (Mol.-Gew. 333.3). Ber. C 57.6, H 5.7, N 12.6.

Gef. » 57.4, » 6.2, » 12.4.

0.4525 g Subst., in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 10.4505 g. Spez. Gewicht = 1.01. Drehung im 2-dm-Rohr bei Natriumlicht und 20° = 3.01° nach rechts.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +34.35^{\circ} (\pm 0.2^{\circ}).$$

Das Dipeptid löst sich ziemlich leicht in Wasser, schwer in Alkohol. Aus der wäßrigen Lösung wird es mit Phosphorwolframsäure als amorphe Masse gefällt. Der Niederschlag färbt sich braun und ist im Überschuß des Fällungsmittels löslich. Tannin erzeugt in konzentrierter, wäßriger Lösung einen zum Teil öligen, zum Teil flockigen Niederschlag. Er löst sich im Überschuß des Fällungsmittels leicht. Eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung bewirkt keine Fällung, ebenso wenig entsteht ein Niederschlag nach Zusatz einer konzentrierten Kochsalzlösung unter gleichzeitiger Zugabe von Salpetersäure. Silbernitratlösung bewirkt flockige Fällung. Mit Kupfersulfat und Natronlauge erhält man eine blauviolette Färbung. Millons Reagens erzeugt zunächst eine weiße Fällung, die sich rasch auflöst. Die Lösung färbt sich dann zuerst gelb, später gelbbraun, darauf tritt starke Trübung ein. Beim Erwärmen klärt sich die Flüssigkeit wieder unter leichter Braunrotfärbung.

Totale Hydrolyse des Dipeptids.

0.75 g *l*-Tryptophyl-*d*-glutaminsäure wurden 8 Stunden mit der 10-fachen Menge 25-prozentiger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde dann mit viel Wasser verdünnt, bis sie 5% an Schwefelsäure enthielt

und nunmehr das Tryptophan in der gewohnten Weise mit einer 10-prozentigen Quecksilbersulfatlösung gefällt. Vom Niederschlag wurde abfiltriert. Er diente nach erfolgter Zerlegung mit Schwefelwasserstoff zur Gewinnung des Tryptophans. Wir gewannen 0.4 g reines Tryptophan.

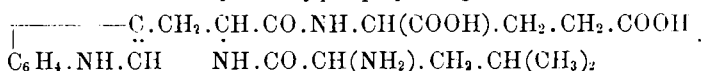
0.1857 g Subst.: 0.4380 g CO₂, 0.0977 g H₂O.

C₁₁H₁₂N₂O₂. Ber. C 64.32, H 5.89.

Gef. » 64.70, » 5.88.

Aus dem Filtrat der Quecksilbersulfatfällung entfernten wir mit Schwefelwasserstoff das Quecksilber und aus dem Filtrat des Quecksilbersulfids die Schwefelsäure mit Baryt. Nun wurde nach Entfernung des Bariumsulfats eingeeengt und die Glutaminsäure nach Einleiten von Salzsäure in die Lösung als salzsaures Salz isoliert. Auf die freie Säure berechnet, wurden 0.3 g Glutaminsäure erhalten.

2. *l*-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure.



d- α -Brom-isocapronyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure.

4 g *l*-Tryptophyl-*d*-glutaminsäure wurden in 18 ccm *n*-Natronlauge gelöst und mit 3.1 g *d*-Bromisocapronylchlorid gekuppelt. Nach dem Ansäuern mit 6 ccm 5-facher *n*-Salzsäure fiel das Kupplungsprodukt aus. Es war zunächst fest, wurde jedoch beim Abfiltrieren ölig. Zur Reinigung wurde es in Äther gelöst und mit Petroläther gefällt. Das zunächst ölige Produkt wurde nach einigem Stehen im Vakuumexsiccator fest. Ausbeute 6.3 g.

Der Bromkörper löst sich leicht in Alkohol, Essigäther und Aceton, weniger leicht in Äther, Benzol und Toluol, schwer in Wasser und Petroläther. Ein Schmelzpunkt ließ sich nicht feststellen. Das Produkt wird beim Erhitzen im Capillarröhrchen ganz allmählich weich. Beim Stehen an der Luft zerfließt es.

Zur Analyse wurde der Bromkörper im Vakuumexsiccator getrocknet. 0.2238 g Subst., nach Kjeldahl verbrannt, gebraucht 12.98 ccm $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure.

C₂₂H₂₉N₃O₆Br (Mol.-Gew. 510.8). Ber. N 8.2. Gef. N 8.0.

l-Leucyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure.

2 g *d*- α -Bromisocapronyl-*l*-tryptophyl-*d*-glutaminsäure wurden in 10 ccm wäßrigem, 25-prozentigem Ammoniak gelöst und 4 Tage bei 37° aufbewahrt. Die Lösung wurde dann mehrmals nach Zusatz von Alkohol unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Beim Einengen der Lösung schied sich das Tripeptid in kleinen Nadelchen aus. Ausbeute 0.85 g. Das Produkt sintert beim

raschen Erhitzen gegen 224° und schmilzt bei 230° (korr.) unter Aufschäumen.

Das Tripeptid ist in kaltem Wasser schwer löslich, in heißem etwas leichter. Hat es sich jedoch gelöst, so krystallisiert es erst nach beträchtlichem Einengen wieder aus. Beim langsamen Eindunsten einer stark eingengten, wäßrigen Lösung krystallisiert das Tripeptid in makroskopischen, zu Drusen vereinigten, derben Blättchen aus.

Quecksilbersulfatlösung fällt die wäßrige Lösung des Tripeptids. Phosphorwolframsäure (1 : 10) erzeugt eine im Überschuß des Lösungsmittels lösliche Fällung. Bei Zusatz einer verdünnten Tanninlösung tritt keine Fällung ein. Gesättigte Ammoniumsulfatlösung bewirkt in der konzentrierten Lösung eine flockige, zum Teil anscheinend krystallinische Ausfällung. Nach Neutralisation mit Ammoniak bewirkt Silbernitrat eine flockige Fällung. Glyoxylsäure-Reaktion positiv, Bromreaktion negativ. Nach Zusatz von Alkali und verdünnter Kupfersulfatlösung tritt Biuret-Reaktion ein (violettrot).

0.1510 g Sbst.: 0.3253 g CO₂, 0.0937g H₂O. — 0.1320 g Sbst., nach Kjeldahl verbrannt, erforderten 11.64 ccm ⁿ/₁₀-Schwefelsäure.

C₂₂H₃₀O₆N₄ (446.40). Ber. C 59.19, H 6.73, N 12.58.
Gef. » 58.76, » 6.94, » 12.35.

Bestimmung des Drehungsvermögens.

0.2015 g Sbst., gelöst in 5 ccm *n*-Salzsäure; *d* = 1.045. Gesamtgewicht der Lösung 5.3069 g. $[\alpha] = +0.69^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = +17.4^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

345. G. Schroeter: Über die Hofmann-Curtiussche, die Beckmannsche und die Benzilsäure-Umlagerung.

[Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn.]

(Eingegangen am 3. Juni 1909; mitgeteilt i. d. Sitzung von Hrn. J. Houben.)

In einem Vortrage gelegentlich der vorjährigen Naturforscherversammlung in Köln¹⁾ habe ich kurz von einigen Versuchen Mitteilung gemacht, welche zur Aufklärung des Chemismus der intramolekularen Atomverschiebungen beitragen, welche man unter den Bezeichnungen der Hofmann-Curtiusschen, der Beckmannschen und der Benzilsäure-Umlagerungen zusammenzufassen pflegt. Dabei schien mir das wesentlichste Ergebnis dies zu sein, daß aus

¹⁾ Autoreferat s. Chem.-Ztg. 1908 Nr. 78: Methoden zur Bildung cyclischer Urethane.