

In heißem Wasser ist die Substanz nur schwer löslich und kristallisiert daraus in kleinen, sechseckigen Blättchen. Die wäßrige Lösung reagiert nicht mit Silbernitrat, enthält also keine Chlorionen, Sehr leicht löst sich das Produkt in Eisessig, Chloroform und Methylalkohol; auch von Aceton, Benzol, Essigester wird es gelöst, nicht aber von Äther und Petroläther. Von verdünnten Säuren und Alkalien wird es in der Hitze nur schwer aufgenommen.

385. Emil Abderhalden und L. E. Weber: Synthese von Polypeptiden. Derivate des *l*-Leucins.

[Aus dem Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule, Berlin.]

(Eingegangen am 15. August 1910.)

Die Polypeptide eignen sich in ganz hervorragendem Maße als Substrat zu Untersuchungen über die Wirkung der peptolytischen Fermente. Wendet man optisch-aktive Polypeptide an, dann läßt sich der Gang der Hydrolyse unter der Einwirkung einer Fermentlösung sehr leicht durch die Beobachtung der Änderung des ursprünglichen Drehungsvermögens feststellen. Werden komplizierter gebaute Polypeptide angewandt, dann läßt sich aus der Art der Drehungsänderung erkennen, in welcher Art das Substrat abgebaut wird. Ein Beispiel möge das eben Gesagte erläutern. Gehen wir von einem Tripeptid, z. B. *d*-Alanyl-glycyl-glycin, aus. Dieses dreht 31° nach rechts. Wird bei der Spaltung durch Fermente zuerst *d*-Alanin frei, dann muß das Drehungsvermögen der Lösung abnehmen, denn das entstehende Dipeptid Glycyl-glycin ist optisch-inaktiv. Wird dagegen zuerst Glykokoll abgespalten, dann erhalten wir *d*-Alanyl-glycin. Dieses dreht stärker nach rechts als das Ausgangsmaterial, nämlich $+50^\circ$. Der direkte Versuch hat ergeben, daß die peptolytischen Fermente der normalen Gewebe das genannte Tripeptid in der zuerst genannten Art abbauen. Dagegen wurde das Tripeptid von Preßsaft aus Carcinomzellen wiederholt in umgekehrter Weise gespalten. Es eröffnet sich hier ein weites Feld zu vergleichenden Untersuchungen über die Art der peptolytischen Zellfermente normaler und pathologisch veränderter Gewebe.

Damit dieses Gebiet erfolgreich bearbeitet werden kann, ist es notwendig, eine große Zahl von Polypeptiden aufzubauen, an deren Bau die in der Natur vorkommenden Aminosäuren beteiligt sind. Es ist notwendig, alle einzelnen Zwischenstufen, die zum Aufbau komplizierterer Polypeptide führen, genau zu kennen, damit man in der

Lage ist, aus der Art der Änderung des ursprünglichen Drehungsvermögens zu beurteilen, über welche Abbaustufen die Hydrolyse im einzelnen Fall führt.

Um Material zu diesen Studien zu gewinnen, haben wir folgende Polypeptide dargestellt: Glycyl-*l*-leucin, *l*-Leucyl-glycyl-*l*-leucin, Glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin, *l*-Leucyl-glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin. Von diesen Polypeptiden waren die beiden ersten schon bekannt.

Wir haben mit dieser Untersuchung noch ein anderes Problem in Angriff genommen. Es interessierte uns die Frage, welchen Einfluß die abwechselnde Einführung der Gruppen Glycyl und Leucyl auf das Drehungsvermögen hat. Die folgende Übersicht zeigt, daß nach Einführung von Glycyl die Linksdrehung in 10-prozentiger Salzsäure jedesmal ganz beträchtlich zunahm, während Leucyl im entgegengesetzten Sinne wirkte. Die Zahl der Beobachtungen ist noch zu klein, um Gesetzmäßigkeiten abzuleiten.

	Spezifische Drehung in 10-proz. Salzsäure
<i>l</i> -Leucin	— 15°
Glycyl- <i>l</i> -leucin	— 31°
<i>l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucin	+ 6°
Glycyl- <i>l</i> -leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucin	— 51°
<i>l</i> Leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucin	— 14.5°

Experimenteller Teil.

Als Ausgangsmaterial diente aus Isovaleraldehyd dargestelltes *d,l*-Leucin, das nach den Angaben von Emil Fischer über die Formylverbindung in seine beiden optisch-aktiven Komponenten zerlegt wurde. Die *l*-Komponente benutzten wir direkt zum Aufbau, indem wir sie mit Chloracetylchlorid kuppelten. Das *d*-Leucin diente zur Darstellung der *d*-Bromisocaprinsäure. Wir machten hierbei wiederholt die Beobachtung, daß bei der Ausführung der Umwandlung des *d*-Leucins in die Bromsäure beim Zusatz des Broms ein krystallinisches Produkt ausfiel. Die Analyse ergab, daß das bromwasserstoffsäure Salz des Leucins auskrystallisiert war. Wiederholt traten bei der Destillation der *d*-Bromisocaprinsäure insofern Schwierigkeiten auf, als ein Teil des erhaltenen Produktes 100° höher siedete als die normale Säure. Während der Destillation oder doch bald nachher trat Zersetzung ein, und dann zeigte das Produkt den richtigen Siedepunkt. Es ist uns nicht geglückt, die Natur dieses anormal siedenden Produktes aufzuklären. Es zeigte auffallenderweise eine ähnliche Drehung wie die normale Säure. Beim Zusatz von Ammoniak erhielten wir *d*-Leucin, das die richtige Drehung aufwies. Wir hatten

zunächst an ein Bromwasserstoff-Additionsprodukt gedacht, weil wir bei der Zersetzung Bromwasserstoff isolieren konnten. Seine Menge war jedoch zu gering. Eine Brombestimmung ergab, daß die hoch siedende Säure ein Atom Brom mehr enthält als die normale Säure. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die gemachten Beobachtungen aufzuklären. Erwähnt sei noch, daß wir festgestellt haben, daß man die *d*-Bromisocapronsäure mehrere Tage aufbewahren kann, ohne daß das Drehungsvermögen zurückgeht. Das Gleiche gilt auch für die *d*-Brompropionsäure.

Glycyl-*l*-leucin¹⁾, $\text{CH}_2(\text{NH}_2) \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}(\text{C}_4\text{H}_9) \cdot \text{COOH}$.
Chloracetyl-*l*-leucin.

6 g *l*-Leucin wurden in 46 ccm *n*-NaOH (1 Mol.) gelöst und bei niedriger Temperatur mit 10.2 g Chloracetylchlorid (2 Mol.) und 162 ccm *n*-NaOH (3.5 Mol.) gekuppelt. Beim Ansäuern mit 18 ccm 5-fachnormaler Salzsäure fiel das Kupplungsprodukt aus. Nicht unwesentliche Mengen sind noch mit Äther extrahierbar. Gesamtausbeute 7 g.

Für die Drehungsbestimmung wird die Substanz aus wenig Wasser umgelöst.

Die Substanz schmilzt bei 139—140° (korr.).

0.2106 g Sbst. in Alkohol gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 3.337 g
Sie drehte das Natriumlicht — 0.66°. Spez. Gew. 0.805. Mithin

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.1^{\circ}$$

Glycyl-*l*-leucin.

10 g Chloracetyl-*l*-leucin wurden mit 100 ccm 25-proz. Ammoniak 4 Tage bei 37° aufbewahrt. Dann wurde im Vakuum eingedampft, in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol in der Hitze bis zur Trübung versetzt. Beim Erkalten krystallisierte das Dipeptid in Blättchen.

Das Produkt färbt sich gegen 240° (korr. 246°) braun und schmilzt unter Zersetzung gegen 250° (korr. 256°).

0.1190 g Sbst. wurden in 10-proz. Salzsäure gelöst. Das Gesamtgewicht der Lösung betrug 4.288 g. Spez. Gewicht 1.05. Die Lösung drehte im 1-dm-Rohr Natriumlicht 0.90° nach links. Mithin

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -31^{\circ}$$

Nach dem Eindampfen der Mutterlauge des Dipeptids und Ausziehen mit Wasser blieb ein Produkt zurück, welches sich in den

¹⁾ Emil Fischer und Josef Steingröver: Synthese von Polypeptiden. XXIX. Derivate des Leucins, *d*-Alanins und Glykokolls. Ann. d. Chem. **365**, 167 [1909].

gewöhnlichen Lösungsmitteln als fast unlöslich erwies. Es wurde gereinigt durch Suspendieren in kochendem Alkohol und Zugabe von wäßrigem Ammoniak, bis Lösung eintrat. Beim Verdampfen des Ammoniaks fiel das Produkt in Blättchen aus und zeigte einen Schmelzpunkt von 218° (korr. 223°).

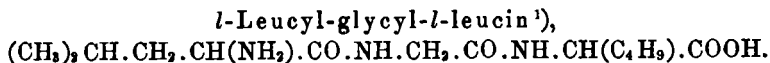
Die Analyse gab folgende Werte.

0.1538 g Sbst.: 0.3010 g CO₂, 0.1156 g H₂O. — 0.1180 g Sbst.: 11.8 ccm N (22°, 758 mm).

C 53.38, N 8.41, N 11.4.

Es läßt sich keine gut stimmende Formel aus diesen Zahlen berechnen.

Mit Kupferoxyd gekocht, gibt das Produkt eine blaue Lösung. Es ist uns nicht gelungen, die Herkunft dieser Verbindung klarzustellen und ihre Zusammensetzung aufzuklären.



d- α -Bromisocapronyl-glycyl-*l*-leucin.

3.5 g Glycyl-*l*-leucin wurden in 18.6 ccm *n*-NaOH (1 Mol.) gelöst und mit 4.8 g *d*- α -Bromisocapronylchlorid (1.2 Mol.) und 28 ccm *n*-NaOH (1.5 Mol.) gekuppelt. Beim Ansäuern mit 5 ccm 5-fachnormaler Salzsäure fiel das Kupplungsprodukt als Öl aus. Es wurde jedoch bei 12-stündigem Stehen in Kältemischung fest. Ausbeute 5 g. Es wurde mit Petroläther gewaschen und aus 50-proz. Alkohol umgelöst. Es kristallisierte in Nadeln. Das Produkt schmilzt bei 99° (korr. 101°).

Für die Analyse wurde bei 100° im Vakuumtrockenapparat über Phosphorperoxyd getrocknet.

0.1916 g Sbst. brauchten nach Kjeldahl 11.0 ccm $\frac{1}{10}$ -H₂SO₄.

0.1705 g Sbst.: 0.2872 g CO₂, 0.1039 g H₂O. — 0.1553 g Sbst.: 0.0810 g AgBr.

C₁₄H₃₅O₄N₂Br (365.2). Ber. C 46.03, H 6.85, N 7.7, Br 21.9.
Gef. > 45.94, > 6.81, > 8.0, > 22.2.

0.1936 g Sbst. wurden in absolutem Alkohol gelöst. Das Gesamtgewicht der Lösung betrug 5.839 g. Spez. Gewicht 0.82. Die Lösung drehte im 1-dm-Rohr Natriumlicht 0.86° nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = +30.4^\circ.$$

Die Substanz ist in Wasser schwer löslich, dagegen sehr leicht löslich in Alkohol, Essigester und Äther.

¹⁾ Vergl. Emil Fischer und Josef Steingröver, l. c.

l-Leucyl-glycyl-*l*-leucin.

10 g *d*- α -Bromisocapronyl-glycyl-*l*-leucin wurden in 100 ccm 25-proz. Ammoniaks gelöst und fünf Tage bei 37° aufbewahrt. Dann wurde unter Zusatz von Alkohol unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Das Abdampfen mit Alkohol wurde mehrmals wiederholt. Um das Bromammonium zu entfernen, haben wir das Produkt mit wenig Wasser ausgelaugt. Eine bessere Ausbeute erhält man, wenn die wäßrige Lösung mit Silbersulfat geschüttelt und das Bromammonium auf diesem Wege entfernt wird. Die Ausbeute beträgt im letzteren Falle 6 g. Das Produkt wird am besten durch Auflösen in kochendem ammoniakhaltigem Alkohol und Abkochen des Ammoniaks gereinigt. Dabei fällt das Tripeptid als körniges Pulver aus.

Das Tripeptid färbt sich gegen 240° braun und schmilzt bei 250—260° (korr. 256—266°) unter Zersetzung.

Für die Analyse wurde über Phosphorpentoxyd bei 100° im Vakuum getrocknet.

0.1042 g Sbst. brauchten nach Kjeldahl 10.6 ccm $\frac{1}{10}$ -H₂SO₄.

0.1537 g Sbst.: 0.3106 g CO₂, 0.1253 g H₂O.

C₁₄H₂₇O₄N₃ (301.3). Ber. C 55.81, H 9.04, N 13.9.

Gef. > 55.11, > 9.06, > 14.2.

0.3692 g Sbst. wurden in 10-prozentiger Salzsäure gelöst. Das Gesamtgewicht der Lösung betrug 10.524 g. Spez. Gewicht 1.02. Die Lösung drehte im 1-dm-Rohr Natriumlicht 0.22° nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 6.0^\circ.$$

Glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin,

CH₂(NH₂).CO.NH.CH(C₄H₉).CO.NH.CH₂.CO.NH.CH(C₄H₉).COOH.

Chloracetyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin.

5 g *l*-Leucyl-glycyl-*l*-leucin wurden in 17 ccm *n*-NaOH gelöst (1 Mol.) und mit 3.7 g Chloracetylchlorid (2 Mol.) und 43 ccm *n*-NaOH (2.5 Mol.) gekuppelt. Nach dem Ansäuern mit 5 ccm 5-fachnormaler Salzsäure fällt ein Öl aus, welches beim Anreiben mit Äther sich in kleine Nadeln verwandelt. Es ist nicht gelungen, das Produkt, das äußerst hygroskopisch ist, umzukristallisieren. Die Ausbeute betrug 3.5 g.

Für die Analyse wurde im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0.1502 g Sbst. brauchten nach Kjeldahl 12.3 ccm $\frac{1}{10}$ -H₂SO₄.

0.1384 g Sbst.: 0.2563 g CO₂, 0.0954 g H₂O. — 0.1454 g Sbst.: 0.0564 g AgCl.

C₁₆H₂₆O₅N₃Cl (377.9). Ber. C 50.86, H 7.42, N 11.4, Cl 9.4.

Gef. • 50.51, > 7.71, > 11.4, > 9.6.

0.1460 g Sbst. wurden in absolutem Alkohol gelöst. Die Lösung, vom Gesamtgewicht 3.230 g und dem spez. Gewicht 0.803, drehte Natriumlicht im 1-dm-Rohr 0.33° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -9.1^\circ.$$

Das Produkt ist sehr leicht löslich in Alkohol, Essigester und Chloroform, etwas schwerer in Äther. Die Substanz hat keinen richtigen Schmelzpunkt, sondern wird von 70° an weich.

Glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin.

3.0 g Chloracetyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin wurden mit 30 ccm 25-prozentigen Ammoniaks 7 Tage bei 37° aufbewahrt. Die Lösung wurde dann unter Alkoholzusatz unter vermindertem Druck eingedampft. Es hinterblieb ein Sirup, der auch nach mehrmaligem Abdampfen mit Alkohol nicht fest wurde. Er wurde in wenig absolutem Alkohol gelöst. Bald schied sich die größte Menge des Chlorammoniums ab. Nach längerem Stehen fiel auch das Tetrapeptid in Form eines körnigen Pulvers aus. Die Ausbeute war sehr gering. Sie wurde auch nicht besser, als wir die Amidierung mit flüssigem Ammoniak im eingeschlossenen Rohre vornahmen. Offenbar entstehen in größerer Menge ungesättigte Verbindungen.

Das Produkt wurde durch Auflösen in ammoniakhaltigem Alkohol gereinigt. Beim Verdunsten des Ammoniaks schied sich das Tetrapeptid als körniges Pulver aus. Im Capillarrohr rasch erhitzt, färbt sich die Substanz gegen 240° braun und schmilzt bei $250\text{--}251^\circ$ (korr. $256\text{--}257^\circ$).

Die Substanz gibt eine sehr starke Biuret-Reaktion.

Für die Analyse wurde über Phosphorpentoxyd bei 100° im Vakuum getrocknet.

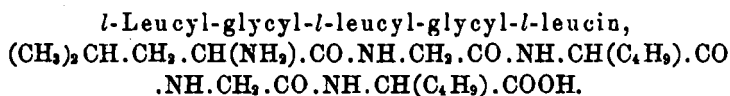
0.1430 g Sbst. brauchten nach Kjeldahl 15.9 ccm $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$.

I. 0.1409 g Sbst.: 0.2723 g CO_2 , 0.1058 g H_2O . — II. 0.1539 g Sbst.: 0.3033 g CO_2 , 0.1236 g H_2O . — III. 0.1214 g Sbst.: 0.2352 g CO_2 , 0.0920 g H_2O .

	I.	II.	III.
$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_4$ (358.4). Ber. C 53.63.	Gef. C 52.71,	53.75,	52.84.
	» H 8.38.	» H 8.40,	8.98, 8.48.
	» N 15.7.	» N 15.6.	

0.1632 g Sbst. wurden in 10-prozentiger Salzsäure gelöst. Diese Lösung, vom Gesamtgewicht 7.230 g und vom spez. Gewicht 1.02, drehte Natriumlicht 1.19° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -51.0^\circ.$$



4.3 g Glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin wurden in 12 ccm *n*-NaOH (1 Mol.) gelöst und mit 4 g *d*- α -Bromisocapronylchlorid (1.5 Mol.) und 24 ccm *n*-NaOH (2 Mol.) gekuppelt. Beim Ansäuern mit 5 ccm 5-*n*. Salzsäure fiel das Kupplungsprodukt ölig aus. Da es nicht fest zu erhalten war, wurde es sofort in 30 ccm 25-proz. Ammoniaks gelöst und 7 Tage bei 37° aufbewahrt. Die filtrierte Lösung wurde unter Alkoholzusatz eingedampft. Nach mehrmaligem Abdampfen wurde es allmählich zum Teil fest. Es empfiehlt sich auch hier, das Bromammonium mit Silbersulfat zu entfernen. Beim Umlösen des Pentapeptids aus ammoniakhaltigem Alkohol und Verdampfen des Ammoniaks wird das Pentapeptid als krystallinisches Pulver gefällt. Die Ausbeute ist auch in diesem Falle infolge Bildung ungesättigter Verbindungen schlecht. Im Capillarrohr erhitzt, wird die Substanz gegen 210° braun und schmilzt unter Zersetzung zwischen 250—260° (korr. 256—266°).

0.1372 g Sbst. brauchten nach Kjeldahl 14.7 ccm $\frac{1}{10}$ -H₂SO₄.

0.1396 g Sbst.: 0.2845 g CO₂, 0.1134 g H₂O.

C₃₂H₄₁O₆N₅ (471.5). Ber. C 55.58, H 9.08, N 15.0.

Gef. » 56.05, » 8.70, » 14.8.

0.0998 g Sbst. wurden in 10-prozentiger Salzsäure gelöst. Die Lösung, vom Gesamtgewicht 3.561 g und vom spez. Gewicht 1.08, drehte im 2 $\frac{1}{2}$ -dem-Rohr das Natriumlicht 0.11° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -14.5^\circ.$$

386. Emil Abderhalden und Paul Hirsch:

Synthese von Polypeptiden. Derivate des Isoleucins. III.

[Aus dem Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule, Berlin.]

(Eingegangen am 15. August 1910.)

In Verfolgung der in den früheren Mitteilungen geschilderten Ziele haben wir einige weitere Isoleucin enthaltende Polypeptide dargestellt. Wir gingen zunächst von dem in der ersten Mitteilung¹⁾ beschriebenen *l*-Leucyl-*d*-isoleucin aus. Wir erhielten ein Präparat, das ein wesentlich besseres Drehungsvermögen zeigte als das früher erhaltene.

¹⁾ Emil Abderhalden, Paul Hirsch und Josef Schuler: Synthese von Polypeptiden: Derivate des Isoleucins, diese Berichte 42, 3394 [1909].