

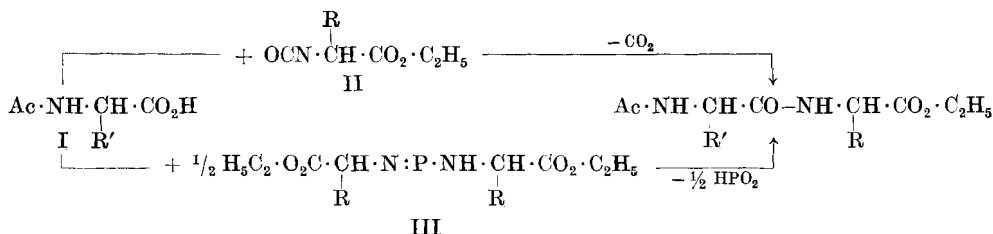
186. Stefan Goldschmidt und Christian Jutz: Über Peptid-Synthesen, III. Mitteil.: Eine neue Synthese des Glutathions*)

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München]

(Eingegangen am 30. Mai 1953)

Es wird eine neue, vom *S*-Benzyl-*l*-cystein ausgehende Synthese des Glutathions beschrieben, die in einfacherer Weise und mit besseren Ausbeuten als bisher zum Ziel führt, wobei die von dem einen von uns (G) und Mitarbb. entwickelten Methoden der Peptid-Synthese unter Benützung der „Carbonylamino-säureester“ bzw. der Phosphorazo-Derivate von Aminosäure- und Peptidestern zur Anwendung kommen.

Die Möglichkeit, Peptide in präparativ einfacher Weise und mit vorzüglichen Ausbeuten aus den Acylaminosäuren (I) und Acylpeptiden mit α -Carbonylamino-fettsäureestern („ α -Isocyanat-fettsäureestern“) (II)¹) oder mit den Phosphorazo-Derivaten von Aminosäure- bzw. Peptidestern (III)²) aufzubauen, veranlaßte uns, mit diesen Methoden auch die Darstellung komplizierterer Peptide, wie des Glutathions, zu versuchen.



Dieses biologisch bedeutsame Tripeptid, ein γ -*l*-Glutaminy-*l*-cysteinyl-glycin spielt bei zahlreichen Redox-Vorgängen im Organismus eine Rolle und entfaltet als Coenzym der Glyoxalase³) und bei der Triosephosphat-Dehydrierung⁴) eine spezifische Wirkung. Wegen seiner ungewöhnlichen γ -Peptidbindung wird es von Proteasen (Pepsin, Trypsin, Papain) und Aminopeptidasen nicht gespalten und kommt daher in allen tierischen und vielen pflanzlichen Geweben frei vor. Gegen hydrolysierende Reagenzien, ja schon heißes Wasser, erweist sich die γ -Peptidbindung aber so empfindlich, daß sie bei allen beschriebenen Synthesen als letzte geknüpft wird. Verhältnismäßig spät nach der Entdeckung des Glutathions durch F. C. Hopkins⁵) konnten C. R. Harrington und T. H. Mead⁶) erstmals eine strukturbeweisende Synthese des Glutathions mittels der Cbzo-Methode⁷) ausführen. Im Phosphoniumjodid fanden sie ein Reagens, das in Eisessig-Lösung die reduktive Abspaltung der Cbzo-Gruppen auch in Anwesenheit von Schwefel erlaubte. Vom Di-Cbzo-cystin ausgehend, erhielten sie über das Säurechlorid den Cysteinyl-glycinester, der mit dem Säurechlorid des Cbzo-glutaminsäure- α -esters gekuppelt wurde. Die

*) Herrn Kollegen Ernst Weitz zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹) St. Goldschmidt u. M. Wick, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 [1951].

²) St. Goldschmidt u. H. Lautenschlager, Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 [1953].

³) K. Lohmann, Biochem. Z. **262**, 137 [1933].

⁴) E. Racker u. I. Krimsky, J. biol. Chemistry **198**, 731 [1952].

⁵) Biochem. J. **15**, 286 [1921].

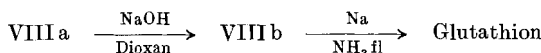
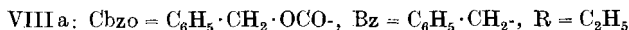
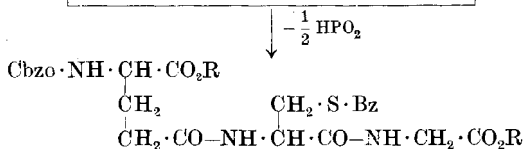
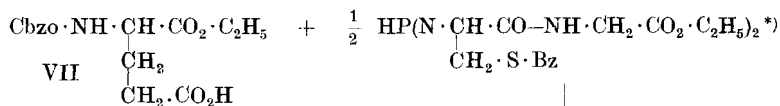
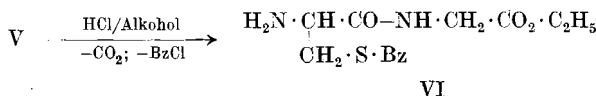
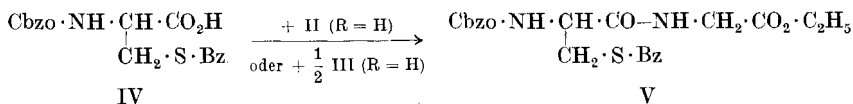
⁶) Biochem. J. **29**, 1602 [1935].

⁷) Cbzo = Carbobenzoxy.

Ausbeuten in der letzten Stufe betragen nur 11% d.Theorie. Eine Verbesserung der genannten Methode erreichten A. S. Loring und V. du Vigneaud⁸⁾ dadurch, daß sie den Cbzo-Rest in flüssigem Ammoniak mit Natrium abspalteten. Gleichzeitig konnten sie unter den Bedingungen der Reaktion durch Zugabe von Benzylchlorid Sulfhydrylgruppen benzylieren, bzw. aus den *S*-Benzyl-Verbindungen die Schutzgruppe wieder eliminieren. Ihr Syntheseweg zum Glutathion⁹⁾ ist fast der gleiche wie der von Harrington und Mead. Der hier erhaltene *S*-Benzyl-cysteinyl-glycinester¹⁰⁾ wurde ebenfalls mit Cbzo-glutaminsäurechlorid- α -ester gekuppelt. Die Ausbeuten waren im ganzen etwas besser, betragen aber in der letzten Stufe auch nur 27% d.Theorie.

Von B. Hegedüs¹¹⁾ stammt eine Glutathion-Synthese, in der an Stelle der Säurechloride die entsprechenden Säureazide verwendet werden. Zum Unterschied gegen die früheren Synthesen wird das benötigte Glutaminsäure-Derivat aus Glutaminsäure- γ -äthylester bereitet. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte auch hier mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Diese Synthese brachte keine Verbesserung der Ausbeuten.

Unsere eigenen synthetischen Versuche hatten zunächst das Ziel, die Darstellung des *S*-Benzyl-*l*-cysteinyl-glycinäthylesters (VI) zu verbessern. Wir erreichten dies auf folgendem Wege: *S*-Benzyl-*l*-cystein läßt sich in ausgezeichneter Ausbeute und ohne Racemisierung in seine *N*-Cbzo-Verbindung (IV)



*) Die genaue Konstitution der Phosphorazo-Verbindungen (ob H am P- oder N-Atom) ist noch nicht geklärt. Zur Vereinfachung wurde H am Phosphor angenommen.

⁸⁾ J. biol. Chemistry **111**, 385 [1935].

⁹⁾ V. du Vigneaud u. G. L. Miller, J. biol. Chemistry **116**, 469 [1936].

¹⁰⁾ Bei unseren Versuchen konnten wir eine, von den Autoren betonte, besonders leicht erfolgende Bildung des entsprechenden Benzylmercaptomethyl-diketopiperazins nicht beobachten. Es bildete sich erst nach längerem Erhitzen der alkalischen Esterlösung.

¹¹⁾ Helv. chim. Acta **31**, 737 [1948].

überführen, wenn ein p_H von 8–9 eingehalten wird. Das von uns erhaltene Rohprodukt (90 % d. Th.) zeigte bereits den von V. du Vigneaud und J. L. Wood angegebenen Schmelzpunkt¹²⁾. Bei der Umsetzung von IV mit α -Carbonylamino-essigsäureäthylester (II, R=H) bildet sich über ein instabiles Carbaminsäureanhydrid sofort unter Kohlendioxyd-Verlust (Pyridin als Katalysator) *N*-Cbzo-*S*-benzyl-*L*-cysteinyl-glycinäthylester (V) (92 % d. Th.). Mit fast gleichen Ausbeuten (88 % d. Th.) gelingt die Darstellung mit dem Phosphorazo-Derivat des Glycinesters (III) in Pyridin-Lösung. Die Beobachtungen von Barkdoll¹³⁾, daß Halogenwasserstoffe in wasserfreien Lösungsmitteln die Cbzo-Gruppe abspalten können, ohne vorhandene Estergruppen zu verändern, machten wir uns zunutze und erhielten mit Chlorwasserstoff in absol. alkoholischer Lösung aus dem Cbzo-Dipeptidester V in 85–90-proz. Ausbeute d. Th. den freien Ester VI. Damit sparten wir z. B. gegenüber der Synthese von Hegedüs 4 Stufen und erhielten die Esterbase VI, bezogen auf *S*-Benzyl-*L*-cystein in etwa 70-proz. Ausbeute (nach Hegedüs: 10 %).

Zunächst versuchten wir, die Verbindung VI über Di-cbzo-*L*-cystin zu gewinnen. Wir gaben diesen Weg jedoch auf, als sich zeigte, daß die Carbobenzoxylierung des *L*-Cystins unbefriedigend verläuft und zu unreinen Produkten¹⁴⁾ führt.

Aus der Esterbase VI gewannen wir mit Phosphortrichlorid in Pyridin die Phosphorazo-Verbindung, die mit *N*-Cbzo-*L*-glutaminsäure- α -äthylester (VII)¹⁵⁾ gekuppelt wurde, den wir durch Alkoholyse des *N*-Cbzo-*L*-glutaminsäure-anhydrids erhielten. Da hierbei auch erhebliche Mengen des γ -Esters entstehen¹⁶⁾, wurde nach den Angaben von W. J. Le Quesne und G. T. Young¹⁷⁾ der reine α -Ester (VII) in kristallisierter Form aus dem Gemisch durch fraktionierte Extraktion mittels Soda-Lösung auf Grund der verschiedenen Acidität von α - und γ -Isomeren isoliert. Die Umsetzung zum Cbzo-*S*-benzyl-glutathion-diester (VIIIa) verläuft mit guten Ausbeuten (85–90 %) und liefert ihn in großer Reinheit. Infolgedessen entsteht die Dicarbonsäure VIIIb bei der Verseifung auch in besserer Ausbeute (90 % d. Th.) als nach du Vigneaud (72 % d. Th.). Da nach der Phosphorazo-Methode die Umsetzungen mit stöchiometrischen Mengen verlaufen, wird ein Überschuß einer der beiden kostbaren Komponenten wie bei anderen Synthesen vermieden. Die Schutzgruppen entfernten wir nach du Vigneaud und Miller⁹⁾ und erhielten nach der üblichen Reinigung kristallisiertes, reines Glutathion (27 % d. Th.).

Wir sind bemüht, auch bei der letzten Stufe noch eine Verbesserung der Ausbeuten zu erzielen. Die Identität des synthetischen Produktes mit Glutathion wurde außer durch Analyse und Vergleich mit natürlichem Material auch papierchromatographisch bestätigt, wobei gleiches Verhalten festgestellt wurde (Butanol/Eisessig 2 Flecke; Hydrolyse?).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Fond der Chemie sprechen wir für die Bereitstellung von Mitteln, die die Durchführung der Arbeit ermöglicht haben, unseren ergebenen Dank aus.

¹²⁾ J. biol. Chemistry **130**, 110 [1939].

¹³⁾ A. E. Barkdoll u. W. F. Ross, J. Amer. chem. Soc. **66**, 951 [1944].

¹⁴⁾ W. B. Holly u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. **74**, 4539 [1952], berichten ebenfalls, daß sie nur 80-proz. Produkte von Di-cbzo-cystin erhalten haben, die sich kaum reinigen ließen.

¹⁵⁾ M. Bergmann, L. Zervas u. L. Salzmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1288 [1938].

¹⁶⁾ I. Melville, Biochem. J. **29**, 179 [1935]. ¹⁷⁾ J. chem. Soc. [London] **1950**, 1958.

Beschreibung der Versuche

S-Benzyl-*l*-cystein: Nach Wood und du Vigneaud¹²⁾ wurden 60 g *l*-Cystin in 1.5 l flüss. Ammoniak der Hydrogenolyse mit Natrium unterworfen (verbraucht wurden etwa 35 g Natrium = 6 Atome auf 1 Mol. Cystin). Nach Benzilyerung (65 ccm Benzylchlorid) wurden 100 g (95 % d.Th.) *S*-Benzyl-*l*-cystein in nahezu weißen Plättchen erhalten, die aus viel heißem Wasser umkristallisiert wurden.

$[\alpha]_D^{20}$: +28.5° (in *n*NaOH, *c*=1.5); Lit.: $[\alpha]_D^{20}$: +29°¹²⁾. Schmp. 208–211°.

$C_{10}H_{13}O_2NS$ (211.3) Gef. Äquiv.-Gew. 211

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-*l*-cystein (IV): Zu einer Lösung von 75 g *S*-Benzyl-*l*-cystein in 380 ccm *n*NaOH läßt man unter kräftigem Turbinieren und Eiskühlung allmählich 65 ccm frisch dargestellten Kohlendioxid-monobenzylesterchlorids und gleichzeitig 200 ccm 2*n*NaOH zutropfen, wobei p_H 9–10 während der ganzen Umsetzung möglichst genau eingehalten werden soll. Das Rühren wird noch eine weitere Stunde ohne Außenkühlung fortgesetzt und dann durch Zugabe von Wasser das ölig ausgeschiedene Natriumsalz wieder in Lösung gebracht. Nach Filtrieren und 4–5maligem Ausäthern wird die Lösung mit etwa 18-proz. Salzsäure kongosauer gemacht. Das ausgefallene Öl erstarrt rasch kristallinisch. Man läßt das Gemisch einige Zeit im Eisschrank stehen und saugt die Kristalle ab; Ausb. 115 g (90% d.Th.) vom Schmp. 95°.

Umkristallisieren aus Essigester + Petroläther liefert feine, weiße Nadeln; Schmp. 99° (Lit.¹²⁾); Schmp. 93–95°.

$C_{18}H_{19}O_4NS$ (345.4) Gef. Äquival.-Gew. 344

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-*l*-cysteinyl-glycinäthylester (V): a) 85 g *N*-Cbzo-*S*-benzyl-*l*-cystein und 31.8 g α -Carbonylamino-essigester (II, R=H)¹⁾ werden mit 10 ccm wasserfreiem Pyridin übergossen, wobei sich die Masse unter Selbsterwärmung, Aufschäumen und heftiger Kohlendioxid-Entwicklung verflüssigt. Nach Abklingen der Hauptreaktion erhitzt man noch 2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad. Die Reaktionsmasse ist dann zu einem schwachgelblichen Kristallkuchen erstarrt, den man in 700 ccm Essigester löst. Die Lösung wurde zweimal mit je 100 ccm 2*n*HCl und anschließend mit 100 ccm 10-proz. Soda-Lösung ausgeschüttelt (Entfernung des Pyridins und nichtumgesetzter Cbzo-aminosäure). Dann wird die Ester-Lösung mit Wasser gewaschen, getrocknet und filtriert. Der Essigester wird unter etwas vermindertem Druck abdestilliert und der krist. Rückstand aus Essigester + Petroläther umkristallisiert. Feine, weiße Nadeln; Ausb. 97.2 g (92% d.Th.). Schmp. 98–99°; $[\alpha]_D^{20}$: –26.8° (in Eisessig, *c*=6).

$C_{22}H_{26}O_5N_2S$ (430.5) Ber. N 6.51 Gef. N 6.51

b) 2.8 g Glycinäthylester-hydrochlorid wurden durch kurzes Erwärmen in 50 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst. Zur abgekühlten Masse, die fast vollständig erstarrte, tropfte man unter Schütteln bei 0° 0.875 ccm reines Phosphortrichlorid in 10 ccm wasserfreiem Pyridin und fügte dann 7.0 g *N*-Cbzo-*S*-benzyl-*l*-cystein zu. Nachdem alles in Lösung gegangen war, erhitzte man das Gemisch noch 4 Stdn. auf dem 80° heißen Wasserbad. Nach Abdestillieren des Pyridins i. Vak. wurde der Rückstand in 100 ccm Essigester aufgenommen und wie unter a) weiterverarbeitet. Ausb. 7.6 g (88% d.Th.); Schmp. und Misch-Schmp. mit a) 98–99°.

S-Benzyl-*l*-cysteinyl-glycinäthylester (VI): 20 g *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-*l*-cysteinyl-glycinäthylester (V) löst man in 200 ccm absol. Äthanol und leitet ohne Kühlung Chlorwasserstoff bis zur Sättigung ein. Zum Schluß wird das Gemisch 2 Stdn. auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Man destilliert Alkohol, Chlorwasserstoff und entstandenes Benzylchlorid i. Vak. ab und löst den gelblichen, harzartigen Rückstand in 200 ccm absol. Alkohol, leitet wiederum Chlorwasserstoff ein und verarbeitet wie oben. Zum Schluß wird der Rückstand in 60 ccm Eiswasser gelöst. Dabei scheidet sich meist eine kleine Menge unveränderter Cbzo-Verbindung in weißen Flocken ab, von denen abfiltriert wird. Das Filtrat wird zuerst mit Äther ausgeschüttelt und dann mit 50 ccm Chloroform unterschichtet. Das Gemisch wird mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung deutlich alkalisch gemacht und der freie Ester durch Schütteln in die Chloroformschicht übergeführt, die abgetrennt wird. Die wäßr. Phase wird noch ein zweites Mal

mit 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten und getrockneten Chloroform-Auszüge hinterlassen nach dem Abdestillieren des Chloroforms i. Vak. etwa 12 g freien Ester als schwach gelbliches, nicht destillierbares Öl, das nicht zur Kristallisation zu bringen ist; Ausb. 85–90% d. Theorie.

Benzyl-mercaptomethyl-diketopiperazin¹⁸): 0.7 g des freien Esters wurden in etwas Alkohol + Wasser gelöst, einige Tropfen 10-proz. Soda-Lösung zugefügt und 20 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Beim Abkühlen erhielt man feine, weiße Nadeln, die mehrmals aus wenig siedendem Wasser umkristallisiert wurden; Schmp. gegen 190° (Zers.).

N-Carbobenzoxy-*l*-glutaminsäure¹⁹): In eine eisgekühlte Suspension von 44 g *l*-Glutaminsäure und 50 g Natriumhydrogencarbonat in 230 ccm Wasser läßt man bei kräftigem Turbinieren allmählich 48 ccm Kohlensäure-monobenzylesterchlorid und zugleich 150 ccm 2*n*NaOH so schnell eintropfen, daß die Operation innerhalb 1½ Stdn. beendet ist und das p_H ziemlich genau zwischen 8 und 9 verbleibt²⁰). Man rührt noch weitere 2 Stdn. ohne Außenkühlung, filtriert die Lösung, äthert 4–5 mal aus und macht sie mit etwa 18-proz. Salzsäure kongosauer. Dann trennt man vom ausgefallenen Öl und schüttelt die wäbr. Schicht dreimal mit je 100 ccm Essigester aus. Die Extrakte werden mit dem Öl vereinigt und mit 50 ccm etwa 18-proz. Salzsäure gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Essigesters i. Vak. hinterbleibt ein farbloses, dickes Öl, das mit wenig heißem Essigester aufgenommen und mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung versetzt wird. Beim Reiben setzt sehr bald Kristallisation ein; man gibt dann weitere 200 ccm Petroläther zu und rührt, bis die Masse vollkommen pulverig geworden ist. Nach Stehenlassen im Eisschrank erhält man 55–67 g (65–80% d. Th.) der Cbzo-*l*-glutaminsäure, die durch Umkristallisieren aus Wasser ganz rein in faserigen Kristallen erhalten wird. Schmp. 120–121°; $[\alpha]_D^{20}$: –7.9° (in Eisessig, $c=10$), Lit.¹⁹): $[\alpha]_D^{20}$: –7.1°.

$C_{13}H_{15}O_6N$ (281.3) Gef. Äquiv.-Gew. 280

N-Carbobenzoxy-*l*-glutaminsäure-anhydrid: Nach der Vorschrift von Quesne und Young¹⁷) wurden 60 g Cbzo-*l*-glutaminsäure mit 150 ccm Acetanhydrid ohne Erwärmen umgesetzt. Ausb. an reiner Verbindung: 48–49.5 g (86–90% d. Th.); Schmp. 94°.

N-Carbobenzoxy-*l*-glutaminsäure- α -äthylester (VII): Man löst 35 g *N*-Cbzo-*l*-glutaminsäure-anhydrid in 200 ccm absol., warmem Äthanol und fügt nach raschem Abkühlen auf einmal eine Lösung von 3.3 g Natrium in 60 ccm Äthanol (genau äquiv. Menge) zu. Nach Entfernung des Alkohols i. Vak. wird der verbleibende Rückstand in Eiswasser gelöst, die Lösung zweimal mit Äther gewaschen und mit etwa 18-proz. Salzsäure kongosauer gemacht. Das ausfallende Öl nimmt man in Äther auf und schüttelt die wäbr. Phase noch zweimal mit Äther aus. Die vereinigten Ätherextrakte werden nacheinander mit 4 Portionen wäbr. Natriumcarbonat-Lösung (jede 1.5 g Natriumcarbonat enthaltend) extrahiert; zuletzt verwendet man so viel Natriumcarbonat-Lösung, daß kein Kohlendioxyd mehr entweicht. Der dritte, bzw. vierte Extrakt liefert beim Ansäuern mit verd. Salzsäure ein farbloses Öl, das bald erstarrt und das Monohydrat des gesuchten Esters darstellt. Aus Fraktion 1 und 2 erhält man zunächst durch Ansäuern nur nichtkristallisierende Öle, die bei nochmaliger Fraktionierung mit entsprechenden Mengen Natriumcarbonat-Lösung eine weitere kleine Menge des gewünschten Esters liefern. Aus den nichtkristallisierten Anteilen und dem Rückstand der Äther-Lösung läßt sich durch schonende Verseifung Cbzo-*l*-glutaminsäure zurückgewinnen, die erneut zu den Umsetzungen verwendet werden kann. Ausb. an wasserfreiem Ester nach Trocknen über Diphosphorpentoxyd 16.5 g (40% d. Th.); Schmp. 46–48°²¹).

¹⁸) L. C. King u. F. H. Suydam, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5499 [1952].

¹⁹) M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

²⁰) Arbeitet man bei höherem p_H , so erhält man auch nach längerem Stehenlassen nur schlecht kristallisierende, halbfeste Massen, die wegen Verunreinigung mit der Racem-Verbindung wertlos sind, während die Ausbeuten stark zurückgehen, wenn das p_H niedriger als 8 geblieben ist.

²¹) Die Vorschrift von Quesne und Young (J. Chem. Soc. [London] **1950**, 1954) ergab beim Nacharbeiten in größeren Ansätzen nur 35% d. Theorie.

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-glutathion-diäthylester (VIIIa) (*N*-Carbobenzoxy-*l*-glutaminyl]-*S*-benzyl-*l*-cysteinyl-glycin-diäthylester): 13.3 g *S*-Benzyl-*l*-cysteinyl-glycinäthylester (VI) werden in 100 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und unter Umschütteln bei Eiskühlung mit 1.92 ccm Phosphortrichlorid in 10 ccm wasserfreiem Pyridin versetzt. Dann gibt man 13 g Cbzo-*l*-glutaminsäure- α -äthylester (VII) hinzu, erhitzt das Gemisch 3 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad und destilliert das Pyridin i. Vak. ab. Der Rückstand wird in 120 ccm Essigester aufgenommen, die Esterlösung filtriert und je einmal mit 10 ccm 2*n*HCl und gesätt. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die getrocknete Lösung wird bis zur Trübung mit etwa 200 ccm Petroläther versetzt. Man erhält 20 g fast weißen Rohester VIIIa vom Schmp. 90–95° (90% d.Th.).

Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Wasser + Alkohol steigt der Schmelzpunkt auf 105–107°.

$C_{29}H_{37}O_6N_3S$ (587.8) Ber. C 59.2 H 6.3 N 7.2 Gef. C 58.95 H 6.21 N 7.22

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-glutathion^{9, 11} (VIIIb): 10 g des rohen Diäthylesters VIIIa werden in 140 ccm Dioxan + Wasser (1:1) gelöst und unter Kühlung langsam tropfenweise mit 20 ccm 2*n*NaOH versetzt. Nach 1stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird die Lösung auf p_H 6 gebracht und der größte Teil Dioxan + Wasser i. Vak. bei 35° abdestilliert. Man nimmt den Rückstand in Wasser auf, überschichtet die Lösung mit 300–400 ccm Essigester, macht sie mit halbkonzentrierter Salzsäure kongosauer und schüttelt gut durch. Die Esterschicht wird abgetrennt und zweimal mit Wasser gewaschen. Aus ihr führt man nun die Dicarbonsäure wieder in die wäßr. Schicht über, indem man Natriumhydrogencarbonat-Lösung zufügt, bis beim Durchschütteln kein Kohlendioxid mehr entweicht. Die wäßr. Lösung wird mit Tierkohle entfärbt und nach Filtration mit etwa 18-proz. Salzsäure kongosauer gemacht. Das dabei ausfallende, bald erstarrende Öl läßt man im Eisschrank stehen und saugt ab. Ausb. 8.1 g (90% d.Th.); Schmp. 125° nach Sintern bei 85°.

Glutathion (*l*-Glutaminyl-*l*-cysteinyl-glycin): Nach den Angaben von du Vigneaud und Miller⁹) wurden 7.4 g *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-glutathion (VIIIb) der Hydrogenolyse in flüssigem Ammoniak mit Natriummetall unterworfen und über Quecksilber(II)- und Kupfer(I)-mercaptid gereinigt und isoliert.

Ausb. an rohem Kupfer-glutathion: 3.2 g (61% d.Th.). Reines, krist. Glutathion: 1.15 g (27% d.Th.); Schmp. 190–192° bei schnellem Erhitzen (Zers.).

$C_{10}H_{17}O_6N_3S$ (307.3) Äquiv.-Gew. 304, 306²²⁾

$[\alpha]_D^{17}$: –17.4° (in Wasser; $c=2.8$); Lit.: –21.0^{8, 6)}, –18.5²³⁾, –16⁹⁾.

²²⁾ Bestimmt durch jodometr. Titration der SH-Gruppe.

²³⁾ G. F. Hopkins, J. biol. Chemistry 84, 269 [1930].