

## 52. Emil Abderhalden und Andor Fodor: Synthese von hochmolekularen Polypeptiden aus Glykokoll und *L*-Leucin.

[Aus dem Physiologischen Institut der Universität Halle a. S.]

(Eingegangen am 26. Januar 1916.)

Die Polypeptide eignen sich in vorzüglicher Weise zum Studium der Wirkung bestimmter Fermentgruppen. Zahlreiche Fragen stehen noch offen. Vor allem interessiert das Problem der mehr oder weniger scharfen spezifischen Einstellung der einzelnen Fermentarten. Durch Darstellung ganzer Reihen von aus den gleichen Bausteinen bestehenden Polypeptiden mit verschieden langer Kette muß es möglich sein, unter Anwendung physikalischer Methoden, speziell durch die Bestimmung der optimalen Reaktion für die Wirkung einer Fermente enthaltenden Flüssigkeit, herauszufinden, welche besonderen Bedingungen erfüllt sein müssen, um dem Ferment den Angriff zu ermöglichen. Ferner muß man feststellen können, ob diese Bedingungen bei jedem Polypeptid bei Anwendung der gleichen Fermentlösung die gleichen sind oder aber, ob sich Unterschiede finden. Es ist a priori möglich, daß die Art der am Aufbau der Polypeptide beteiligten Bausteine von ausschlaggebender Bedeutung für die Angriffsmöglichkeit durch bestimmte Fermente ist. Man kann sich vorstellen, daß es Polypeptide spaltende Fermente gibt, die auf die Alaningruppe eingestellt sind, andere auf die Leucingruppe usw. Die Polypeptide geben vorzügliche und relativ leicht zu beschaffende Modelle zum Studium solcher Fragen ab. Man kann den gleichen Baustein bald die Polypeptidkette eröffnen lassen, bald diese mit ihm beschließen. Mit wenig Ausnahmen können wir die einzelnen Aminosäuren, dank den von Emil Fischer geschaffenen Methoden, an jede beliebige Stelle im Molekül bringen.

Der Wunsch, auf ganz breiter Basis Fermentstudien durchführen zu können, bei denen das Substrat eine bekannte Größe darstellt, führte zu den im Folgenden mitgeteilten Verbindungen. Über die Fermentversuche selbst soll an anderer Stelle berichtet werden.

Noch ein anderer Grund führte uns zur Synthese möglichst hochmolekularer Polypeptide. Es sollte der Versuch unternommen werden, festzustellen, von welchem Molekulargewicht an sich kolloidale Eigenschaften der dargestellten Verbindungen nachweisen lassen. Es muß unser Bestreben bleiben, durch Synthese ein Modell eines Eiweißkörpers zu erhalten, an dem sich die verschiedenen Eigenschaften der Proteine studieren lassen. Es besteht sehr wenig Aussicht, die chemische Einheitlichkeit eines natürlich vorkommenden Eiweißes eindeutig zu beweisen. Die Möglichkeit, daß Gemische vorliegen,

dürfte schwer auszuschalten sein. Aus diesem Grunde haben zahlreiche Untersuchungen über die chemischen, physikalischen und auch biologischen Eigenschaften bestimmter Proteine nur einen relativen Wert.

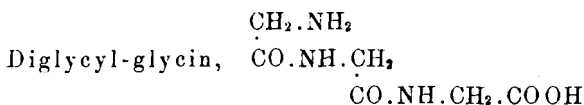
Die Synthese der im Folgenden beschriebenen Verbindungen stieß insofern auf Hindernisse, als die Trennung der hochmolekularen Halogenkörper vom Bromisocapronyl-diglycyl-glycino, das sich aus seinem zur Synthese angewandten Chlorid (*d*-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid) bildet und in großem Überschusse vorhanden ist, zum Teil große Schwierigkeiten bereitete. Die von E. Fischer <sup>1)</sup> dargestellten hochmolekularen Halogenkörper, die an Leucingruppen ärmer, an Glykokoll hingegen relativ reicher waren, als die von uns gewonnenen, besaßen die bequeme Eigenschaft, beim Ansäuern der alkalischen Kuppungsflüssigkeit unmittelbar auszufallen. Bei uns verhielt sich der aus 7 Bausteinen aufgebaute Halogenkörper (*d*-Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin) ebenso. Je höher wir aber die Synthese führten, um so größer wurde die Löslichkeit der Halogenprodukte. Das *d*-Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin fiel beim Ansäuern erst allmählich nach längerem Stehen aus. Das um 4 Bausteine höhere *d*-Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin und das 19-fache *d*-Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin schieden sich beim Ansäuern nicht mehr ab und ebensowenig beim Verdampfen der sauren Lösung, das stets unter Minderdruck bei 35° vorgenommen wurde. Löste man aber den als Rückstand verbleibenden Sirup in absolutem Alkohol auf, filtrierte vom Kochsalz rasch ab, so erhielt man zunächst ein ziemlich klares Filtrat, das sich aber innerhalb weniger Minuten trübte und alsbald eine dicke, voluminöse Ausscheidung des hochmolekularen Produktes ergab. Die Hauptmasse des Bromisocapronyl-diglycyl-glycins blieb in der alkoholischen Mutterlauge, daneben aber auch eine nicht unbeträchtliche Menge des hochmolekularen Halogenkörpers, dessen vollständige Isolierung aus der großen Masse des Bromisocapronyl-diglycyl-glycins unmöglich ist. Dieser Umstand verringerte bei der Darstellung der höheren Polypeptide die Ausbeute ganz erheblich. Zu dieser einen Schwierigkeit gesellte sich ferner die zweite, daß bei der Reinigung der rohen Halogenkörper durch Behandlung mit heißem Alkohol (zur Entfernung des beigemengten Bromisocapronyl-diglycyl-glycins) infolge Löslichkeitsbeeinflussung auch ein Anteil des hochmolekularen Produktes mitgelöst wurde, obgleich die ganz reinen Körper in Alkohol sehr schwer löslich sind.

<sup>1)</sup> B. 40, 1754 [1907].

Auch die Gewinnung der unten beschriebenen, hochmolekularen Polypeptide war nicht ganz einfach. Sie lösen sich schwer in kaltem Wasser, leichter in der Hitze, kommen jedoch beim Einengen der Lösung nur schwer wieder zur Abscheidung. Dadurch wird die Reinigung von Beimengungen sehr erschwert. Sie ist nur durch wiederholtes Umfällen der konzentrierten wäßrigen Lösung mit Alkohol durchführbar.

Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht über einige Eigenschaften der neu gewonnenen Produkte. Erwähnt sei noch, daß das aus 19 Bausteinen bestehende Polypeptid ein Molekulargewicht von 1326 besitzt.

Polypeptid	Lösungsmittel für die Best. der spezif. Drehung	$[\alpha]_D^{20}$	Biuret- reaktion	Verhalten der Lösung des Polypeptids bei ihrer Sätti- gung mit Am- moniumsulfat	Auf- lösbarkeit in kaltem Wasser
<i>L</i> -Leucyl-glycyl-glycin	Wasser	+ 45.90°	Blauviolett	wird nicht ausgesalzen	sehr leicht
<i>L</i> -Leucyl-triglycyl-glycin	Wasser	+ 28.14°	Blauviolett	wird nicht ausgesalzen	leicht
<i>L</i> -Leucyl-pentaglycyl- glycin	1/10-norm. Natronlauge	+ 5.94°	Rotviolett	wird ausgesalzen	zieml. leicht
<i>L</i> -Leucyl-triglycyl- <i>L</i> -leu- cyl-pentaglycyl-glycin		— 6.00°	Rotviolett	wird ausgesalzen	schwer
<i>L</i> -Leucyl-triglycyl- <i>L</i> -leu- cyl-triglycyl- <i>L</i> -leucyl- pentaglycyl-glycin		— 9.63°	Rotviolett	wird ausgesalzen	schwer
<i>L</i> -Leucyl-triglycyl- <i>L</i> -leu- cyl-triglycyl- <i>L</i> -leucyl- pentaglycyl-glycin		— 8.42°	Rotviolett	wird ausgesalzen	schwer



Als Ausgangsprodukt für die Darstellung größerer Mengen von Diglycyl-glycin eignet sich am besten das Glycinanhydrid, das sich nach dem Verfahren von Emil Fischer aus dem salzsauren Äthylester des Glykokolls in bequemer Weise gewinnen läßt. Das Glycinanhydrid wird zu seiner Aufspaltung in Glycyl-glycin in fein pulverisiertem Zustand in 1 Mol. doppelnormaler Natronlauge durch intensives Schütteln bei Zimmertemperatur in Lösung gebracht. In dieser wird die Kupplung mit 1.25 Mol. Chlor-acetylchlorid unter An-

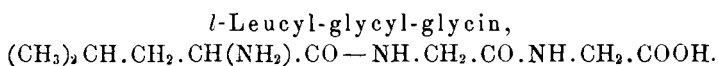
wendung von 1.5 Mol. der doppelnormalen Lauge in der gewohnten Weise vollzogen. Beim Ansäuern der filtrierten alkalischen Flüssigkeit mit der äquivalenten fünffachnormalen Salzsäuremenge scheidet sich die Hauptmasse des Chloracetyl-glycyl-glycins nach einigem Stehen in der Kälte direkt aus. Rascher aber gewinnt man die Gesamtausbeute, wenn man die angesäuerte Lösung bei 35° etwas einengt. Das so erhaltene Produkt, das beinahe ganz rein ist, wird aus heißem Wasser unter Tierkohlezusatz umkrystallisiert und das reine Chloracetylderivat aminiert.

Für die Gewinnung eines ganz reinen Präparates von Diglycyl-glycin in guter Ausbeute ist die Aminierungstemperatur von größter Bedeutung. Zweierlei muß ausgeschlossen werden. Das rohe Tripeptid muß bereits in rein krystallinischer Form ohne jede Beimengung von öligen Massen zur Ausscheidung gelangen. Ferner muß die Bildung von Glycinanhydrid vermieden werden. Dies wird erreicht, wenn die Aminierung bei 37° mit der dreifachen Menge 25-prozentigen Ammoniaks vollzogen und die Dauer seiner Einwirkung nicht über 24 Stunden ausgedehnt wird.

Zur Gewinnung des Tripeptids wird die filtrierte Aminierungsflüssigkeit bei 37° eingedampft, das Eindampfen nach Zusatz von Alkohol wiederholt und der feste, nicht sirupöse Rückstand in der eben ausreichenden Menge heißen Wassers aufgelöst. Die heiße Lösung wird hierauf mit ebenfalls heißem absoluten Alkohol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das zuerst ausfallende Produkt ist nur so lange ölig, als das Gemisch noch heiß ist. Sobald es in Eis gestellt wird, beginnt sogleich die Abscheidung des Tripeptids in fester, krystallinischer Form. Nach vollständiger Erkaltung stellt das Gemisch einen dichten, ziemlich voluminösen, aber keineswegs gallertartigen Brei dar, der sich rasch absaugen läßt. Hält man die angeführten Aminierungsbedingungen nicht ein, so ist die erstarrte Masse mit sehr viel öligen Produkten verunreinigt und bietet beim Abnutschen erhebliche Schwierigkeiten.

Das so erhaltene Rohprodukt ist von so hohem Reinheitsgrade, daß man es zur weiteren Synthese sofort verwenden kann.

Die Ausbeute beträgt 50 g aus 90 g Glycinanhydrid.



#### 1. *d*-Bromisocapronyl-glycyl-glycin.

3 g Glycinanhydrid wurden in 1 Mol. norm. Natronlauge gelöst und unter Kühlung mit 1.25 Mol. *d*- $\alpha$ -Bromisocapronylchlorid unter Zusatz von 1.5 Mol. norm. Natronlauge in der bekannten Weise ge-

kuppelt. Nach dem Ansäuern mit der äquivalenten Menge an 5-fach-normaler Chlorwasserstoffsäure wurde das Kupplungsprodukt sofort in schönen glänzenden Krystallen abgeschieden (5 g).

Das Rohprodukt wurde aus siedendem Essigester umkrystallisiert. Beim Erkalten schied sich das reine Bromisocapronyl-glycyl-glycin in makroskopischen, glänzenden Blättchen ab, die bei 130—132° zu einer klaren Flüssigkeit schmelzen.

Aus absolutem Alkohol krystallisiert das Produkt bei der Verdunstung der Lösung in von einem Zentrum ausgehenden, baumförmig verzweigten Nadeln, die unter dem Mikroskop als sichelförmig gekrümmte Prismen erscheinen. Bei langsamer Verdunstung einer wäßrigen Lösung erhält man entweder feine, verfilzte Nadeln oder aber kugelige Aggregate mikroskopisch langer Nadeln.

Löslichkeit: In heißem Essigester löst sich das Produkt ziemlich leicht, schwerer in der Kälte. In Alkohol leicht löslich.

Optisches Verhalten: In abs. Alkohol: 0.2789 g Sbst. in abs. Alkohol gelöst. Gesamtgew.: 6.3659 g;  $d = 0.806$ ,  $\alpha = +0.83^\circ$  (5-cm-Rohr):  $[\alpha]_D^{26} = +47.01^\circ$ .

In Wasser: 0.2250 g Sbst. in Wasser. Gesamtgew.: 15.4591 g;  $d = 1.014$ ,  $\alpha = +0.23^\circ$  (5-cm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +31.17^\circ$ .

In  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge: 0.0823 g Sbst. gelöst. Gesamtgew. 3.0770;  $d = 1.026$ ,  $\alpha = +0.72^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +26.24^\circ$ .

0.1589 g Sbst.: 0.2254 g CO<sub>2</sub>, 0.0792 g H<sub>2</sub>O. — 0.1668 g Sbst.: 0.1015 g AgBr. — 0.1810 g Sbst.: 11.60 ccm  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nach Kjeldahl.

C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Br (309.11). Ber. C 38.82, H 5.54, Br 25.87, N 9.28.  
Gef. » 38.68, » 5.58, » 25.90, » 8.97.

## 2. Aminierung zu *l*-Leucyl-glycyl-glycin.

4 g des Bromkörpers wurden in der 5-fachen Menge 25-prozentigen Ammoniaks gelöst und die Lösung 4 Tage hindurch bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Jetzt wurde das Ammoniak im Vakuum bei ca. 35° verjagt und die Lösung, die sehr stark schäumte, unter Zusatz von Alkohol eingedampft.

Der Rückstand wurde in heißem Wasser aufgelöst und mit heißem Alkohol zur Ausfällung gebracht. Die Krystallisation wurde durch 12-stündiges Stehen in der Kälte vervollständigt. Zur Bestimmung der optischen Drehung sowie zur Analyse wurde das Produkt aus seiner wäßrigen Lösung mit Alkohol nochmals umgefällt und scharf getrocknet (2.5 g).

Löslichkeit: In Wasser löst sich der Körper ziemlich leicht, sehr schwer hingegen in absolutem Alkohol. Die wäßrige Lösung gibt die Biurettreaktion mit blavioletttem Ton.

Optisches Verhalten: 0.4453 g Sbst. in Wasser gelöst. Gesamtgew.: 15.2542 g,  $d = 1.030$ ;  $\alpha = +1.30^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +43.42^\circ$ .

Die Mutterlauge der zweiten Umfällung lieferte eine zweite Krystallisation: 0.2846 g Sbst. in Wasser. Gesamtgew.: 8.5486 g,  $d = 1.034$ ;  $\alpha = +0.79^\circ$  (5-cm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +45.90^\circ$ .

Eine zweite Darstellung auf demselben Wege lieferte ein Produkt mit folgendem optischen Verhalten: 0.1075 g Sbst. in Wasser. Gesamtgew.: 2.3862 g,  $d = 1.011$ ;  $\alpha = +2.04^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +44.79^\circ$ .

0.1619 g Sbst.: 0.2887 g  $\text{CO}_2$ , 0.1101 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.1560 g Sbst.: 19.05 ccm  $\frac{1}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$  nach Kjeldahl.

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_3$  (245.17). Ber. C 48.95, H 7.81, N 17.14.

Gef. » 48.63, » 7.61, » 17.11.

#### *l*-Leucyl-triglycyl-glycin,

$(\text{CH}_3)_2\text{CH}.\text{CH}_2.\text{CH}(\text{NH}_2).\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO})_3 - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$ .

1. *d*-Bromisocapronyl-triglycyl-glycin. Triglycyl-glycin, das nach E. Fischers Vorschrift bereitet wurde, ist in 1 Mol. Normalnatronlauge aufgelöst und in der üblichen Weise mit 1.25 Mol. *d*-Bromisocapronylchlorid unter Zusatz von 1.5 Mol. Normalnatronlauge gekuppelt worden. Beim Ansäuern mit der äquivalenten Menge an 5-fach-normaler Salzsäure fiel das Kupplungsprodukt zunächst als Öl aus, das jedoch nach 12-stündigem Stehen in der Kälte erstarrte und abgenutscht werden konnte. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt mit Essigester, in dem es sich nicht löst, ausgekocht und das ausgekochte, gewaschene und getrocknete Produkt, das einen Schmelzpunkt von  $186-188^\circ$  besaß, einer Umkrystallisation aus der ca. 20-fachen Menge siedenden Wassers unterworfen. Beim Abkühlen dieser Lösung schieden sich sogleich schöne blättchenförmige Krystalle ab, die nach 24 Stunden abgesaugt, gewaschen und getrocknet wurden. Der Schmelzpunkt blieb der gleiche. Das Produkt schmilzt zu einer klaren gelblichen Flüssigkeit.

Löslichkeit: In heißem Essigester ist die Substanz fast unlöslich, ebenso in heißem Alkohol oder Äther. Sie löst sich dagegen in etwa der 20-fachen Menge siedenden Wassers.

Optisches Verhalten: 0.3101 g Sbst. in Wasser gelöst. Gesamtgew.: 24.1419 g;  $d = 1.001$ ,  $\alpha = +0.58^\circ$  (2-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +22.55^\circ$ .

0.0979 g Sbst. in  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge gelöst. Gesamtgew.: 3.0809 g;  $d = 1.013$ ,  $\alpha = +0.82^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +25.47^\circ$ .

0.1793 g Sbst.: 0.2598 g  $\text{CO}_2$ , 0.0883 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.1176 g Sbst.: 0.0519 g Ag Br. — 0.2002 g Sbst.: 18.90 ccm  $\frac{1}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$  nach Kjeldahl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{BrN}_4$  (423.33). Ber. C 39.68, H 5.47, Br 18.88, N 13.24.

Gef. » 39.52, » 5.51, » 18.78, » 13.23.

2. Aminierung zu *l*-Leucyl-triglycyl-glycin: 4 g des vorher beschriebenen Halogenkörpers wurden in der 10-fachen bei 0° gesättigten Ammoniakmenge suspendiert und nach kurzer Zeit in Lösung gebracht. Nach 2-tägigem Stehen wurde die filtrierte ammoniakalische Flüssigkeit im Vakuum unter Alkoholzusatz verdampft und die konzentrierte wäßrige Lösung des Eindampfrückstandes mit Alkohol zur Fällung gebracht. Die entstandene Ausscheidung besaß ein gequollenes Aussehen und gab nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen ein farbloses, halogenfreies Pulver (1.5 g). Aus der Mutterlauge schieden sich noch weitere Mengen ab, die aber wegen ihres Halogengehaltes umgefällt werden mußten.

Löslichkeit: Das Produkt ist in Wasser leicht löslich, sehr schwer in absolutem Alkohol. Die wäßrige Lösung ist durch Sättigung mit Ammoniumsulfat nicht fällbar. Sie gibt eine blaue Biuretreaktion.

Optisches Verhalten: 0.4046 g Subst. in Wasser gelöst. Gesamtgew.: 12.7482 g;  $d = 1.030$ ,  $\alpha = +0.92^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = +28.14^\circ$ .

0.1460 g Subst. verbrauchen nach Kjeldahl 20.00 ccm  $n_{10}$ -Schwefelsäure. — 0.0705 g Subst. verbrauchen nach Sørensen 1.80 ccm  $n_{10}$ -Natronlauge.

$C_{14}H_{25}O_6N_5$  (359.24). Ber. N 19.49, Amino-N 3.89.  
Gef. » 19.19, » 3.58.

#### Aufbau von *d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin. I.

Pentaglycyl-glycinmethylester. Als Ausgangsmaterial diente reines Diglycyl-glycin. Es wurde in das Methylesterchlorhydrat übergeführt.

4.8 g Diglycyl-glycinmethylester-chlorhydrat wurden nach der Vorschrift von E. Fischer<sup>1)</sup> in 150 ccm heißem, trockenem Methylalkohol gelöst und zur rasch abgekühlten, klar gebliebenen Lösung die zur Neutralisierung des Chlorwasserstoffs genau berechnete Menge einer 2-prozentigen Natriummethylatlösung hinzugegeben. Hierauf wurde die Lösung bei 12 mm Druck und 35° Außentemperatur eingedampft und der Eindampfrückstand mit 40° warmem Chloroform wiederholt ausgelaut. Es zeigte sich hierbei, daß das Chloroform nur eine geringe Menge Substanz aufgenommen hatte, und daß der unlösliche Rückstand neben etwas Kochsalz große Mengen organischer Substanz enthielt, und zwar, wie es sich bald erwies, bereits das Kondensationsprodukt (Pentaglycyl-glycinmethylester).

<sup>1)</sup> E. Fischer, B. 39, 453 [1906].

## a) Verarbeitung des in Chloroform unlöslichen Anteiles.

Der Rückstand wurde mit überschüssigem siedenden Wasser wiederholt ausgezogen und von einem feinverteilten amorphen Stoff abgetrennt. Das heiße Filtrat wurde abgekühlt.

Es entstand eine weiße Ausscheidung von krystallinischem Habitus, die nach einstündigem Stehen bei  $0^{\circ}$  abgetrennt und auf Ton gepreßt wurde (1 g). Das Produkt zersetzte sich in der Capillare unter starker Bräunung bei  $230-240^{\circ}$ , ohne zu schmelzen.

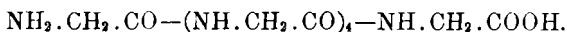
## b) Verarbeitung des Chloroform-Auszuges.

Er wurde mit Äther versetzt, wonach allmählich eine weiße, anscheinend nadelförmige Krystallisation eintrat. Die abgetrennte Substanz wurde in einer flachen Schale etwa 30 Minuten lang auf  $100^{\circ}$  erhitzt und die spröde gewordene Masse mit siedendem Wasser ausgezogen.

Die Auszüge wurden heiß filtriert, wobei als Rückstand wieder eine — scheinbar mit der oben erwähnten identische — amorphe Masse hinterblieb. Auch hier gab das heiße Filtrat nach der Abkühlung eine ähnliche Ausscheidung wie sub a) beschrieben wurde, und zeigte auch in der Capillare das gleiche Verhalten wie jene.

Gesamtausbeute an Pentaglycyl-glyciner: 1.4 g. Die bei 12 mm Druck eingedampften Mutterlaugen ergaben noch 0.4 g von der gleichen Substanz.

## Pentaglycyl-glycin,



Zur Verseifung des Esters (1.4 g) wurde er zunächst in der 5-fachen Menge Wassers gelöst, die Lösung rasch abgekühlt, worauf der Ester in feinverteiltem Zustande zur Ausscheidung gelangte. Nach Hinzufügung von 1.25 Mol. Natronlauge (ca. 11.5-fach-normal) wurde das Gemisch 1 Stunde lang geschüttelt. Die sich hierbei bildende Lösung ist von einer weißen, opaleszierenden Masse durchsetzt. Ohne vorher zu filtrieren, wurde mit etwas mehr als der berechneten Menge 50-prozentiger Essigsäure versetzt, stark abgekühlt und die entstandene dicke Ausscheidung abgesaugt. Während das scharfe Absaugen der Mutterlauge keinerlei Schwierigkeiten verursachte, ließ sich das Waschwasser nur mit Mühe abnutschen, so daß schließlich von einem scharfen Abtrennen Abstand genommen werden mußte.

Es wurde die noch feuchte Masse in wenig Wasser suspendiert und unter Hinzufügung von einigen Tropfen Ammoniak in der Hitze in Lösung gebracht.



Nach dem Aufkochen mit etwas Tierkohle wurde filtriert und das farblose Filtrat am Wasserbad eingedampft. Es hinterließ ca. 1 g einer weißen, körnigen Masse.

*d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin. I.

1 g des so gewonnenen Pentaglycyl-glycins wurde in 1 Mol. *n*-Natronlauge aufgelöst und in der üblichen Weise mit 1.25 Mol. *d*- $\alpha$ -Bromisocapronylchlorid gekuppelt. Die von einer Trübung abfiltrierte Flüssigkeit gab nach dem Ansäuern sofort eine weiße, scheinbar krystallinische Abscheidung, die filtriert, mit kaltem Wasser nachgewaschen, dann mit heißem Alkohol ausgezogen und endlich getrocknet wurde.

Das so erhaltene Produkt zersetzte sich bei 238—240° (unkorr.) unter Gasentwicklung und verhielt sich hierbei genau so, wie das gleichzeitig erhitze, auf anderem Wege (S. 570) erhaltene *d*-Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin.

Optisches Verhalten: 0.0851 g Subst. in  $\frac{1}{10}$  *n*-Natronlauge gelöst. Gesamtgew.: 2.5734 g;  $d = 1.014$ ;  $\alpha$  (1-dm-Rohr):  $= +0.61^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20} = +18.19^\circ$ .

Die auf S. 571 angeführten Drehungsbestimmungen mit dem auf anderem Wege gewonnenen Bromkörper (Diglycyl-glycin + *d*-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid) wurden mit Substanzen vorgenommen, die von verschiedenen Darstellungen herrührten. Die spezifischen Drehungen zeigen untereinander Abweichungen von ca.  $1^\circ$ , je nach dem Reinheitsgrade der schwer zu reinigenden Substanz. Die obige Drehung von  $+18.19^\circ$  stimmt mit jenen Werten überein.

Aufbau von *d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin. II.

*d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid<sup>1)</sup>. Als Ausgangsprodukt für die Chlorierung wurde ein *d*-Bromisocapronyl-diglycyl-glycin benutzt, das aus *d*-Bromisocapronylchlorid (aus optisch reiner *d*-Bromisocapronsäure und Thionylchlorid bereitet; Sdp. bei 0.3 mm 45—46°) und absolut reinem Diglycyl-glycin (s. S. 564) nach der gewöhnlichen Methode dargestellt wurde. Das Rohprodukt wurde nach dem Trocknen auf Ton einmal aus siedendem Wasser, dann nochmals aus heißem Alkohol umkrystallisiert. Als Zeichen von hoher Reinheit dient die Eigenschaft des Produktes, daß seine heiße, konzentrierte, alkoholische Lösung bereits bei mäßiger Abkühlung zu einem völlig festen Brei erstarrt. Dem vorher aus Wasser nicht umkrystallisierten Produkte kommt diese Eigenschaft nicht zu. Hier erfolgt die Ausscheidung erst nach äußerst starkem Einengen in Form

<sup>1)</sup> E. Fischer, loc. cit.

von Krusten an der Gefäßwand. Ebenso verhält sich die alkoholische Mutterlauge vom oben erwähnten Krystallbrei. Dieser wurde scharf abgesaugt, mit wenig Alkohol, ferner mit Äther nachgewaschen und im Exsiccator vorgetrocknet. Unmittelbar vor der Chlorierung wurde die Substanz — am bequemsten verwendet man zu dieser Operation eine Menge von 3—4 g — in einem Phosphorsäureanhydrid-Vakuum-Trockenapparat bei 12 mm Druck und Chloroformdampf-Temperatur 2 Stunden lang getrocknet, dann durch ein Haarsieb getrieben, und die so zerkleinerte Substanz wieder im gleichen Apparat ca. 2 Stunden getrocknet.

Nunmehr wurde die staubfeine, trockne Substanz in ca. 25—30 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid (Kahlbaum), Fraktion 50—52°, suspendiert, das Gemisch stark abgekühlt und in dieses etwas über die berechnete Menge fein pulverisierten Phosphorpentachlorids in mehreren Portionen unter starkem Schütteln eingetragen. Hierauf wurde eine halbe Stunde lang auf der Maschine bei Zimmertemperatur das Schütteln fortgesetzt, wobei die ursprüngliche Suspension in eine visköse, gallertartige Masse verwandelt wurde. Sie wurde in dem von E. Fischer beschriebenen Apparat frei von Luftfeuchtigkeit durch eine Tonkerze abgesaugt, einige Male mit dem gleichen Acetylchlorid und schließlich öfters mit über Phosphorsäureanhydrid getrocknetem Petroläther gewaschen. Nach 2-stündigem Verweilen im Vakuum-exsiccator in Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe und über Phosphorsäureanhydrid wurde nach Volhard analysiert.

In der Regel enthielt die Substanz 84—91% Chlorid. Der Rest bestand offenbar aus unverändertem Bromisocapronyl-diglycyl-glycin. Das Produkt wurde stets sofort zur weiteren Synthese verwendet. Die Ausbeute betrug in der Regel 2.5—2.6 g aus 3 g Ausgangsmaterial.

#### *d. α*-Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin.

2 g Diglycyl-glycin wurden in der berechneten Menge normaler Natronlauge aufgelöst und in die gekühlte Lösung 2.3 g des Chlorids in kleinen Portionen eingetragen. Nach der Hinzufügung der Chloridmenge wurde jedesmal auf der Maschine energisch geschüttelt und diese mechanische Wirkung durch Zugabe von Glasperlen zum Reaktionsgemisch verstärkt. Das Chlorid geht recht bald in Lösung. Die stark schäumende Flüssigkeit wurde stets mit normalem Alkali bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und sodann die nächste Portion des Chlorids eingetragen. Am Schluß wurde durch ein Faltenfilter filtriert und das klare Filtrat in der berechneten Salzsäuremenge (18-prozentig) aufgefangen. Sogleich entstand eine weiße Ausscheidung, die gut abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen werden konnte.

Zur Reinigung von etwa beigemengtem Bromisocapronyl-diglycylglycin wurde die getrocknete Masse mit warmem Alkohol behandelt, abgesaugt und exsiccator trocken gemacht.

Ausbeute 2 g.

Das Produkt sintert bei ca.  $230^{\circ}$  und zersetzt sich unter Dunkelbraunfärbung und Gasentwicklung bei  $235-240^{\circ}$  (unkorr.). Es ist in Wasser schwer löslich, in Alkohol noch schwerer.

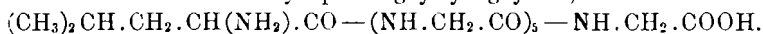
Optisches Verhalten: Die Produkte verschiedener Synthesen ergaben, in  $\frac{1}{10}n$ -Natronlauge gelöst, folgende Drehungswerte:

1. 0.0742 g Subst. Gesamtgew.: 2.5534 g;  $d = 1.013$ ;  $\alpha$  (1-dm-Rohr) =  $+0.56^{\circ}$ .  $[\alpha]_D^{20} = +19.03^{\circ}$ .

2. 0.0315 g Subst. Gesamtgew.: 1.0544 g;  $d = 1.013$ ;  $\alpha = +0.59^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +19.49^{\circ}$ .

3. 0.0947 g Subst. Gesamtgew.: 2.5167 g;  $d = 1.015$ ;  $\alpha = +0.70^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +18.33^{\circ}$ .

#### *l*-Leucyl-pentaglycyl-glycin,



2.4 g des fein pulverisierten Halogenproduktes wurden in einer Druckflasche in 12 ccm einer bei  $0^{\circ}$  gesättigten Lösung von Ammoniak suspendiert und das Gemisch 4 Tage lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Innerhalb dieser Zeit ging die Substanz in Lösung. Nach Öffnung der Druckflasche wurde von einer flockigen Ausscheidung abfiltriert, das Filtrat unter Minderdruck stark eingedampft und die konzentrierte wäßrige Lösung mit Alkohol zur Fällung gebracht. Die voluminöse Ausscheidung wurde abgesaugt und zuerst mit wäßrigem Alkohol, dann mit Alkohol und endlich mit Äther ausgewaschen. Ausbeute: 1.8 g Bromammopium-freies Produkt.

Es löst sich in heißem Wasser ziemlich leicht auf und scheidet sich bei Abkühlung der Lösung nicht mehr ab. Die Abscheidung erfolgt jedoch augenblicklich bei Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat.

Die wäßrige Lösung gibt eine rotviolette Biuret-Reaktion.

1. 4 ccm einer 1-prozentigen Lösung in  $\frac{1}{10}n$ -Natronlauge gaben nach der Methode von van Slyke<sup>1)</sup>: 1.11 ccm N ( $22^{\circ}$ , 733 mm), entsprechend 0.001238 g Amino-N.

2. 1 ccm der gleichen Lösung verbrauchen nach der Mikro-Stickstoffbestimmungsmethode nach Abderhalden und Fodor<sup>2)</sup>: 13.80 ccm  $\frac{1}{10}n$ -Schwefelsäure, entspr. 0.001933 g Gesamt-N.

<sup>1)</sup> D. D. van Slyke, Handb. d. biochemischen Arbeitsmethoden 6, 278 [1912].

<sup>2)</sup> E. Abderhalden und A. Fodor, Münchener medizin. Wochenschrift 1914, 765.

$C_{18}H_{31}N_7O_8$  (473.31). Ber. Amino-N 2.96, Gesamt-N 20.72.  
Gef. » 3.09, » 19.33.

Optisches Verhalten:

1. 0.0854 g Sbst. in  $\frac{1}{10}n$ -Natronlauge (ber. Menge). Gesamtgew.: 2.2376 g;  $d = 1.014$ ,  $\alpha$  (1-dm-Rohr):  $+ 0.20^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = + 5.17^\circ$ .

2. 0.1166 g Sbst. Gesamtgew.: 2.3489 g;  $d = 1.018$ ,  $\alpha = + 0.30^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = + 5.94^\circ$ .

*d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin.

2 g *l*-Leucyl-pentaglycyl-glycin wurden in 1 Mol. norm. Natronlauge unter Zugabe von etwa 20 ccm Wasser unter gelinder Erwärmung in Lösung gebracht und, wie oben (S. 570) geschildert, mit  $2\frac{1}{4}$  Mol. Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid portionenweise unter Kühlung und energischem Schütteln mit Glasperlen, gekuppelt. Am Schlusse wurde die stark schäumende alkalische Flüssigkeit von einer geringen, weißen, kolloiden Ausscheidung abfiltriert und das klare Filtrat mit der berechneten Menge 18-prozentiger Salzsäure angesäuert. Es entstand nach und nach (nicht sofort, wie beim Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin!) eine weiße, anscheinend krystallinische Ausscheidung, die nach mehrstündigem Stehen in Eis abgenutscht wurde. Der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Die gut aussehende, farblose, pulverige Masse betrug dem Gewichte nach 2.5 g. Die Mutterlauge gab nach schwachem Eindunsten bei 12 mm eine weitere Ausbeute von 0.2–0.3 g. Die ganze Menge wurde zur Entfernung von eventuell vorhandenen Spuren von Bromisocapronyl-diglycyl-glycin einmal mit warmem Alkohol ausgezogen.

Die so behandelte Substanz besitzt einen Zersetzungspunkt von  $230$ – $235^\circ$  (unkorr.), löst sich ziemlich leicht in siedendem Wasser, sehr schwer in Alkohol.

In  $\frac{1}{10}n$ -Alkali sowie Ammoniak ist die Substanz spielend leicht löslich. Beim Ansäuern der natronalkalischen Lösung scheidet sie sich langsam aus.

Reinigung. Zur Reinigung wurde in siedendem Wasser gelöst, filtriert und die Lösung abgekühlt, worauf eine schöne Ausscheidung von krystallinischem Habitus entstand, die abgetrennt wurde. Unter dem Mikroskope sieht man deutliche Mikrokrystallformen.

Optisches Verhalten: 0.0994 g Sbst. in  $\frac{1}{10}n$ -Natronlauge gelöst. Gesamtgew.: 2.0665 g;  $d = 1.020$ ;  $\alpha$  (1-dm-Rohr):  $+ 0.36^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = + 7.34^\circ$ .

Nach Pregl: 4.272 mg Sbst.: 6.71 mg  $CO_2$ , 2.36 mg  $H_2O$  (0.60 % Asche). — Nach Carius: 0.1031 g Sbst.: 0.0256 g AgBr. — Nach Abder-

halden und Fodor: 1 ccm einer 1-prozentigen Lösung in  $n_{10}$ -Alkali (= 0.01 g Sbst.) verbrauchten 12.00 ccm  $n_{100}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>Br (821.43). Ber. C 43.82, H 6.01, Br 9.73, N 17.06.

Gef. » 43.10, » 6.22, » 10.57, » 16.81.

*l*-Leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin,

CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

CH<sub>2</sub>

CH.NH<sub>2</sub>

CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

CH<sub>2</sub>

CO-(NH.CH<sub>2</sub>.CO)<sub>3</sub>-NH.CH.CO-(NH.CH<sub>2</sub>.CO)<sub>5</sub>-NH.CH<sub>2</sub>.COOH.

Der vorhin beschriebene Halogenkörper wurde in Portionen von etwa 1.5 g in einem Einschmelzrohre mit 10—15 ccm flüssigem Ammoniak suspendiert und die Röhre etwa 5 Tage lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Es löste sich beinahe alles auf. Nach Öffnen der Röhre wurde der Inhalt der freiwilligen Verdunstung überlassen und der glasartig erstarrte, bräunlich gefärbte Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die wäßrige Lösung wurde unter Alkoholzusatz und vermindertem Druck bis zur beginnenden Ausscheidung eingedampft, der Kolbeninhalt in eine Glasschale übergossen, am Wasserbade wieder bis zur völligen Lösung erwärmt und die heiße Lösung mit absolutem Alkohol vermischt. Man sieht das Polypeptid zuerst als flüssige Phase zur Abscheidung gelangen, die jedoch nach kurzer Zeit in eine voluminöse, aufgequollene Masse übergeht und den ganzen Schaleninhalt ausfüllt. Nach mehrstündigem Stehen wurde diese Ausscheidung abgenutscht, der weiße — oft etwas rosa gefärbte — Filtrückstand zuerst mit wäßrigem, dann mit absolutem Alkohol und endlich mit Äther ausgewaschen. Ausbeute 1.1 g halogenfreie Substanz, die nach dem Trocknen im Exsiccator ein lockeres Pulver vorstellt.

Sie löst sich leicht in verdünnter Lauge und fällt beim Übersäuern wieder in Flocken aus. In heißem Wasser (20-fache Menge) ist das Polypeptid ziemlich leicht löslich und kommt bei Abkühlung der Lösung nicht zur Ausscheidung. Sättigt man aber mit Ammoniumsulfat, so wird es sofort als klebrige Masse ausgesalzen.

Die wäßrige Lösung gibt eine rotviolette Biuret-Reaktion.

1. 5 ccm einer 1-prozentigen Lösung (in der berechneten Menge  $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge + Wasser aufgelöst) gaben nach der Methode von van Slyke

0.98 ccm N (22°, 733 mm), entspr. 0.00108 g Amino-N.

2. 1 ccm der 1-prozentigen Lösung verbrauchte nach der Mikro-Stickstoffbestimmungsmethode von Abderhalden und Fodor:

14.00 ccm  $\frac{1}{100}$  *n*-Schwefelsäure, entspr. 0.00196 g Gesamt-N.

$C_{30}H_{51}N_{11}O_{12}$  (757.50). Ber. Amino-N 1.85, Gesamt-N 20.34.

Gef. » 2.16, » 19.61.

Optisches Verhalten: Eine 1-prozentige Lösung in  $\frac{1}{10}$  *n*-Natronlauge (berechnete Menge + Wasser) dreht im 1-dm-Rohr:  $-0.06^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -6.00^\circ$ .

*d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin.

2 g des vorher beschriebenen 11-fachen Polypeptids wurden in 1 Mol. normaler Natronlauge + 60 ccm Wasser unter gelindem Erwärmen gelöst und wie gewöhnlich (s. oben) mit 4 Mol. *d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid gekuppelt. Nach dem Abfiltrieren der stark schäumenden Reaktionsflüssigkeit durch ein Faltenfilter wurde letztere mit der eben ausreichenden Menge einer 18-prozentigen Salzsäure versetzt, wobei sogleich eine ganz geringe Menge einer flockigen Ausscheidung entstand, die nach ihrem Verhalten unverändertes 11-faches Polypeptid vorstellte.

Die Lösung wurde bei 12 mm Druck eingedampft, der Rückstand, ein gelblicher Sirup, mit Alkohol versetzt und die entstandene Lösung wieder eingedampft. Jetzt wurde der sirupöse Rückstand mit ca. 100 ccm siedendem Alkohol aufgenommen und die alkoholische Lösung vom zurückbleibenden Kochsalz abgenutscht. In wenigen Minuten trübte sich die noch heiße, ursprünglich völlig klare Lösung, und es trat alsbald die Ausscheidung einer voluminösen, breiartigen Masse ein. Der dichte Brei wurde nach wenigen Stunden abgenutscht, der Filtrerrückstand mit heißem Alkohol nachgewaschen und das Waschen schließlich mit Äther zu Ende geführt. Die so gewonnene Substanz wurde zur Trennung von beigemengtem Bromisocapronyl-diglycyl-glycin mit heißem Alkohol verrieben und wieder abgetrennt. Die exsiccator-trockne Masse wog 2.2 g, färbte sich in der Capillare bei  $200^\circ$  braun und zersetzte sich bei  $210$ – $230^\circ$  (unkorr.) unter Aufblähung.

Die alkoholische Mutterlauge enthielt das überschüssige Bromisocapronyl-diglycyl-glycin.

Reinigung: Trotz des Umstandes, daß die Substanz beim Ansäuern ihrer alkalischen Lösung nicht zur Ausscheidung gelangt, ist sie in trockenem Zustand in siedendem Wasser sehr schwer löslich, löst sich jedoch etwa in der 200–250-fachen Wassermenge bei Siedehitze allmählich auf. Zur Abscheidung des Produktes muß man die filtrierte Lösung am Wasserbade stark eindunsten. Bei genügend starker Konzentration sieht man an der Oberfläche der Lösung die

Entstehung feiner blättchenartiger Gebilde, die jedoch unter dem Mikroskop keine deutliche Struktur erkennen lassen. Diese Ausscheidung wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

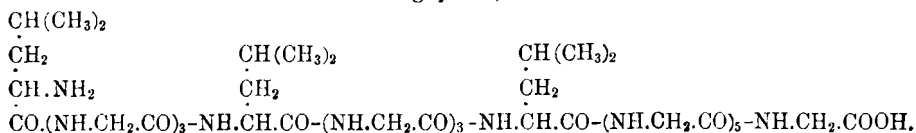
Nach Pregl: 4.850 mg Sbst.: 8.04 mg CO<sub>2</sub>, 3.06 mg H<sub>2</sub>O. — 5.240 mg Sbst.: 8.71 mg CO<sub>2</sub>, 3.14 mg H<sub>2</sub>O. — 5.768 mg Sbst.: 0.98 mg AgBr.

Nach Abderhalden und Fodor: 2.5 ccm einer 0.5-prozentigen Lösung in  $\frac{1}{10}$ -N-Alkali verbrauchen 15.60 ccm  $\frac{1}{100}$ -N-Schwefelsäure.

C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>Br (1105.58). Ber. C 45.59, H 6.29, Br 7.23, N 17.73.  
Gef. » 45.21, 45.33, » 7.06, 6.71, » 7.23, » 17.49.

Optisches Verhalten: Eine 3.75-prozentige Lösung des Halogenkörpers in  $\frac{1}{10}$ -N-Natronlauge besitzt  $\alpha = -0.15^\circ$  (1-dm-Rohr):  $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ .

*l*-Leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycylglycin,



7 g des Bromkörpers wurden in 3 Röhren mit je 20 ccm flüssigem Ammoniak eingeschmolzen und 5 Tage hindurch bei 18° aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit mußten die Röhren geschüttelt werden, um die Auflösung zu beschleunigen. Gleichzeitig wurde eine neue Substanz ausgeschieden, die den Boden und die Wände der Röhren in krystallähnlichen Formen belegte.

Nach dem Öffnen der Röhren wurde das Ammoniak verdunstet und der Rückstand in kaltem Wasser aufgelöst. Bis auf einen ganz geringen unlöslichen flockigen Rückstand ging alles in Lösung.

Die wäßrige Lösung wurde unter vermindertem Druck bis zur beginnenden Ausscheidung eingedunstet und das bereits zu koagulieren beginnende Gemisch in einer Glasschale mit Alkohol vollständig gefällt. Die gallertartige Masse wurde nach längerem Stehen in der Kälte abgesaugt und der Filtrerrückstand zuerst mit wäßrigem, dann mit absolutem Alkohol und endlich mit Äther ausgewaschen. Die im Exsiccator getrocknete Substanz stellt ein farbloses, lockeres, halogenfreies Pulver von 4.8 g Gewicht vor.

1. 5 ccm einer Lösung von 0.0797 g Substanz in 9.9520 ccm Flüssigkeit  $n_{10}^{\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}}$  gaben nach van Slyke:

0.47 ccm N (25.5°, 730 mm), entspr. 0.00052 g Amino-N.

2. 1 ccm einer Lösung von 0.79 % Gehalt an Polypeptid verbrauchen nach Abderhalden und Fodor:

10.80 ccm  $\frac{1}{100}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0.00151 g Gesamt-N.

$C_{42}H_{71}N_{15}O_{16}$  (1041.74). Ber. Amino-N 1.34, Gesamt-N 20.17.

Gef. » 1.29, » 19.15.

Optisches Verhalten: Eine 0.83-prozentige Lösung in  $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge zeigt im 1-dm-Rohr eine Drehung von  $\alpha = -0.08^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -9.63^\circ$ .

Eigenschaften: Das Polypeptid gibt die Biuret-Reaktion mit rot-violettem Ton. Es löst sich in heißem Wasser (etwa in der 20-fachen Menge) mit Leichtigkeit auf, ohne in der Kälte wieder zur Abscheidung zu kommen. Sättigt man die Lösung mit Ammoniumsulfat, so wird der Körper sofort ausgesalzen.

*d*- $\alpha$ -Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin.

1.6 g Pentadekapeptid wurden in der berechneten Menge (1 Mol.) normaler Natronlauge aufgelöst und, wie oben mehrfach beschrieben ist, mit 3 Mol. *d*-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid gekuppelt. Auch hier wurde die stark schäumende Kupplungsflüssigkeit mit eben ausreichender 18-prozentiger Salzsäuremenge angesäuert und, nachdem von einer geringen Trübung abgetrennt worden war, bei 12 mm Druck eingedampft.

Nachdem der sirupöse Eindampfrückstand wieder in absolutem Alkohol aufgelöst und die Lösung abermals völlig eingedunstet worden war, wurden zum zweiten Rückstand etwa 100 ccm Alkohol zugefügt, dann wurde am Wasserbade zum Sieden erhitzt und der in Lösung gegangene Sirup vom zurückgebliebenen Kochsalz abgesaugt. Nach wenigen Minuten schied sich auch hier aus der noch heißen alkoholischen Flüssigkeit das neue Kupplungsprodukt aus und verwandelte den Schaleninhalt in einen dichten Brei. Dieser wurde nach wenigen Stunden abgesaugt, zunächst mit Alkohol, dann mit Äther ausgewaschen. Es hinterblieben nach dem Trocknen im Exsiccator 1.2 g eines lockeren, weißen Pulvers, das sich in der Capillare bei 270–275° unter Aufblähen und Dunkelfärbung zersetzt.

Die alkoholische Mutterlauge enthält hier, sowie auch jene des 15-fachen Bromkörpers, neben dem überschüssigen und aus dem Chlorid zurückgebildeten Bromisocapronyl-diglycyl-glycin noch weitere Mengen der hochmolekularen Substanz, doch scheitert ihre Gewinnung an der großen Schwierigkeit der Trennung von den großen Mengen des Bromisocapronyl-diglycyl-glycins. Auch macht sich bei Trennungsversuchen mittels Alkohols oder Wassers die Löslichkeitsbeeinflussung des zu isolierenden Bromkörpers durch den letzteren Stoff in ungünstiger Weise geltend.



Reinigung: Obgleich auch dieser Halogenkörper beim Ansäuern seiner verdünnten alkalischen Lösung nicht ausgeschieden wird, welche Eigenschaft auf eine leichte Löslichkeit in Wasser schließen läßt, geht die trockne, reine Substanz selbst bei Siedehitze sehr schwer in Lösung mit Wasser. Zur Auflösung von 0.25 g wurden ungefähr 100–120 ccm siedendes Wasser gebraucht. Aus der filtrierten Lösung gelangt jedoch die Substanz erst bei starkem Einengen am Wasserbad zur Ausscheidung. Auf der Oberfläche der stark konzentrierten Lösung entstanden auch hier blättchenförmige Gebilde, die abgetrennt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurden.

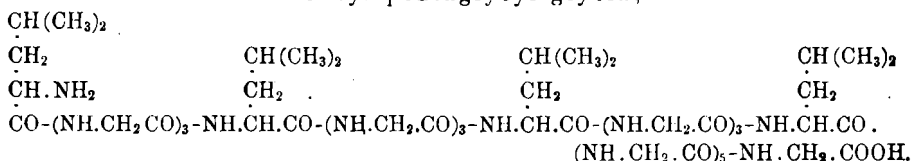
Nach Pregl: 4.820 mg Sbst. (mit 1 % Asche): 8.01 mg CO<sub>2</sub>, 2.81 mg H<sub>2</sub>O. — 5.562 mg Sbst.: 0.830 mg AgBr.

Nach Abderhalden und Fodor: 0.0123 g Sbst.: 15.76 ccm  $\frac{n}{100}$ -Schwefelsäure.

Ber. für	Gef.
C <sub>54</sub> H <sub>89</sub> N <sub>18</sub> BrO <sub>20</sub> (1389.83).	
C 46.63	45.77 (für aschefreie Substanz berechnet)
H 6.30	6.58 ( » » » » )
N 18.15	17.95 ( » aschehaltige » » )
Br 5.75	6.42 ( » aschefreie » » )

Optisches Verhalten: Eine 2.5-prozentige Lösung in  $\frac{1}{10}n$ -Natronlauge besitzt im 1-dm-Rohr:  $\alpha = -0.20^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ .

*l*-Leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-triglycyl-*l*-leucyl-pentaglycyl-glycin,



1 g des vorhin beschriebenen Bromkörpers wurde in der gewohnten Weise mit flüssigem Ammoniak behandelt (5 Tage, Zimmertemperatur). Am Boden und an den Wänden des Einschmelzrohres gelangte auch hier, wie beim Pentadeka-peptid, ein Produkt von krystallinischem Habitus zur Ausscheidung.

Die weitere Behandlung des Reaktionsgemisches geschah in genau der gleichen Weise, wie dies oben beim Pentadeka-peptid angegeben wurde.

Ausbeute: 0.75 g halogenfreies Produkt.

1. 5 ccm einer Lösung, enthaltend 0.0951 g in 9.95 ccm Flüssigkeit (berechnete Menge  $\frac{n}{10}$ -NaOH + Wasser) gaben nach van Slyke:

0.45 ccm N (21°, 734 mm), entspr. 0.000505 g Amino-N.

2. 1 ccm einer Lösung, enthaltend 0.0094 g Subst., verbrauchten nach Abderhalden und Fodor:

13.25 ccm  $\frac{1}{100}$ -Schwefelsäure, entspr. 0.00186 g Gesamt-N.

$C_{54}H_{91}N_{19}O_{20}$  (1325.89). Ber. Amino-N 1.06, Gesamt-N 20.08.

Gef. » 1.06, » 19.75.

Optisches Verhalten: Eine 0.95-prozentige Lösung in  $n/10$ -Alkali + Wasser zeigt im 1-dm-Rohr eine Drehung von  $\alpha = -0.08^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -8.42^\circ$ .

Das Verhalten dieses Körpers in Bezug auf Löslichkeit in Wasser, Aus-salzbarekeit mit Ammoniumsulfat und bei der Biuret-Reaktion deckt sich vollkommen mit jenem der vorhergehenden zwei Polypeptide.

### 53. Adolf Kaufmann und Ernst Rothlin: Über eine neue Synthese des Damascenins.

(Eingegangen am 22. Januar 1916.)

Aus den Samenschalen des Schwarzkümmels — *Nigella damascena* — gewann Schneider<sup>1)</sup> 1890 ein Alkaloid, dem er den Namen Damascenin und die Bruttoformel  $C_{10}H_{15}O_3N$  beilegte. Es schmilzt bei  $27^\circ$ , besitzt für sich und namentlich in indifferenten Lösungsmitteln eine auffallende himmelblaue Fluorescenz und den angenehmen Blütengeruch eines ätherischen Öles. Schimmel & Cie.<sup>2)</sup>, die dasselbe Alkaloid ebenfalls aus dem Schwarzkümmelöl isolierten, bestimmten den Siedepunkt zu  $17^\circ$  bei 10 mm Druck, und die Molekularformel  $C_{10}H_{13}O_3N$ .

Die ersten eingehenden Arbeiten über die Konstitution des in mehrfacher Hinsicht interessanten Alkaloids wurden von Pommerhne<sup>3)</sup>, und an sie anschließend von O. Keller<sup>4)</sup> ausgeführt.

Auf Grund von Analysen zahlreicher Derivate halten sie die Bruttoformel  $C_9H_{11}O_3N$  für richtig; schließlich fand Keller in den Samen von *Nigella aristata* noch eine homologe Base, ein Methyl-damascenin der Formel  $C_{10}H_{13}O_3N$ . Dieses letztere Alkaloid wird dadurch charakterisiert, daß es mit größter Leichtigkeit — schon beim Erhitzen mit Wasser — unter Abspaltung eines Methyls in Damascenin übergehen soll, und letzteres selbst isomerisiert sich beim Behandeln mit alkoholischem Kali, wie schon von Schimmel

<sup>1)</sup> Pharm. Zentralhalle 31, 173—191 [1890]. C. 1890, I, 827.

<sup>2)</sup> Schimmel, C. 1894, II, 55; 1899, II, 40.

<sup>3)</sup> Ar. 237, 475 [1899]; 238, 531 [1900]; 239, 34 [1901]; 242, 299 [1904].

<sup>4)</sup> Ar. 242, 299 [1904]; 246, 1 [1908].