

Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Blut-Plasma und -Serum vom Pferde.

Von

Emil Abderhalden und Berthold Oppler.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1907.)

Durch die Untersuchungen des einen von uns mit H. Deetjen¹⁾ ist gezeigt worden, daß vom Plasma möglichst befreiter Blutkörperchenbrei Polypeptide spaltet. Parallel mit diesen Versuchen sind, wie damals schon bemerkt wurde, Untersuchungen mit Plasma und Serum von uns ausgeführt worden, und zwar in der Weise, daß jedesmal Blutkörperchenbrei und Plasma resp. Serum von demselben Tiere und derselben Blutentnahme stammten. Plasma und Serum wurden stets solange zentrifugiert, bis ein Sediment nicht mehr nachweisbar war. Wir haben folgende Polypeptide auf ihr Verhalten gegen Plasma resp. Serum geprüft: Glycyl-glycin, Glycyl-l-tyrosin, Glycyl-dl-Alanin, dl-Alanyl-glycin, Glycyl-dl-Leucin, Diglycyl-glycin, dl-Alanyl-glycyl-glycin, dl-Leucyl-glycyl-glycin und Triglycyl-glycin. Einen ganz besonderen Wert legen wir auf die Versuche mit Glycyl-l-tyrosin, weil mit diesem Dipeptid hauptsächlich die Parallelversuche mit roten Blutkörperchen und mit Blutplättchen aus Pferdeblut angestellt worden sind. Als erstes und ganz eindeutiges Resultat können wir anführen, daß Glycyl-l-tyrosin vom Plasma in allen unseren Versuchen entweder gar nicht oder doch nur in ganz geringer Menge gespalten worden ist, während die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen dieses Dipeptid sehr energisch hydrolysieren. Auch das Serum hat

¹⁾ Emil Abderhalden und H. Deetjen, Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes. Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 334, 1907. — Weitere Studien über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Pferdeblutes, Ebenda, Bd. LIII, S. 280, 1907.

nur eine ganz unerhebliche Hydrolyse gezeigt. Wir wollen gleich an dieser Stelle bemerken, daß diese geringen Spaltungen höchstwahrscheinlich nicht dem Plasma resp. Serum zuzuschreiben sind, sondern ziemlich sicher auf nicht zu vermeidenden Zerfall von roten Blutkörperchen und beim Serum ganz besonders auch von Blutplättchen zurückzuführen sind. Diese Erklärung der ab und zu auch bei Verwendung anderer Dipeptide beobachteten geringfügigen Hydrolyse wird um so wahrscheinlicher, wenn man einesteils die ganz auffallend geringe Menge der aufgefundenen Spaltprodukte betrachtet und anderenteils bedenkt, wie außerordentlich aktiv sich die in Frage kommenden Fermente der roten Blutkörperchen und der Blutplättchen erwiesen. Es ist gewiß außerordentlich schwer, ein Plasma ohne die geringste Spur von zerfallenen roten Blutkörperchen zu erhalten, beim Serum liegt die Möglichkeit, daß Produkte aus Blutplättchen und Blutkörperchen in dieses übergehen, noch viel näher und ist wohl immer vorhanden. Wie schon erwähnt, zeigten alle Dipeptide, mit einziger Ausnahme des dl-Alanyl-glycins, dasselbe Verhalten, wie das Glycyl-l-tyrosin. dl-Alanyl-glycin wurde sowohl bei Anwendung von Plasma als von Serum (mit Ausnahme des Versuches 2 der Serie 1) deutlich gespalten. Im übrigen war eine deutliche, ausgesprochene Hydrolyse erst bei Anwendung von Tripeptiden und Tetrapeptiden nachweisbar. So wurden speziell Diglycyl-glycin, dl-Alanyl-glycyl-glycin, Triglycyl-glycin sehr erheblich gespalten. Wir verfügen erst über wenige Untersuchungen nach dieser Richtung und können aus diesem Grunde noch nicht entscheiden, ob wir hier eine ganz allgemeine Eigenschaft des Plasmas und Serums vor uns haben. Es ist möglich, daß im Plasma resp. Serum Fermente vorhanden sind, die in ähnlicher Weise, wie dies für den Pankreassaft nachgewiesen ist, nur Polypeptide von bestimmter Struktur angreifen.¹⁾ Jedenfalls sind diese Beobachtungen wertvoll genug, um weiterverfolgt zu werden.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905 und Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft. Ebenda Bd. LI, S. 264, 1907.

Sie erwecken in uns die Hoffnung, die große Klasse der proteolytischen Fermente in bestimmte Gruppen einteilen zu können, die auf bestimmte Abbaustufen eingestellt sind. Es ist vielleicht nicht überflüssig, kurz darauf hinzuweisen, daß die beobachtete Fermentwirkung im Plasma resp. Serum nicht auf etwa resorbierte Fermente des Magendarmkanals zurückzuführen ist. Trypsin und Erepsin spalten ganz besonders leicht Glycyl-l-tyrosin, während bei unseren Versuchen gerade dieses Dipeptid unangegriffen blieb. Zusatz von Trypsin und Erepsin zu Plasma führt bald zur Abscheidung von Tyrosin bei Anwesenheit von Glycyl-l-tyrosin.

Die angeführten Polypeptide sind alle nach den von Emil Fischer angegebenen Methoden dargestellt worden. Einer besonderen Beschreibung bedarf nur die Darstellung des Glycyl-l-tyrosins, weil es gelungen ist, dieses bis jetzt nur im amorphen Zustande bekannte Dipeptid¹⁾ in krystallisiertem Zustande zu erhalten. Wir stellten zunächst in der gewohnten Weise das Chloracetyl-l-tyrosin dar, das durch Umkrystallisieren gereinigt wurde. Dieses reine Produkt ließen wir nun mit der etwa fünf-fachen Menge wässerigen Ammoniaks 4 Tage bei 37° stehen. Nun verdampften wir die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene, lösten den Rückstand in Wasser und verdampften die Lösung nach deren Übersättigung mit Baryt zur Entfernung des Ammoniaks wiederum zur Trockene. Nach Entfernung des Baryts mit etwas überschüssiger Schwefelsäure schüttelten wir die Lösung solange mit Silbersulfat, bis eine filtrierte Probe keine Chlorreaktion mehr zeigte. Wir filtrierten nun ab und entfernten die vorhandene Schwefelsäure mit Baryt und das gelöste Silber mit Salzsäure. Die so vorbehandelte Lösung des Glycyl-l-tyrosins verdampften wir nun abermals unter vermindertem Druck zur Trockene, zuletzt unter Zusatz von Alkohol. Der Rückstand stellte einen dicken Sirup dar. Diesen lösten wir in der gerade genügenden Menge Wasser. Nach kurzer Zeit zeigte sich Krystallbildung. Nach einigem Stehen war die Hauptmasse erstarrt. Sie wurde abfiltriert und die Mutterlauge

¹⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden II. Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch., Jg. 37, S. 2486, 1904.

in etwa 70%igen Alkohol gegossen. Bald trat wiederum Krystallisation ein. Die Mutterlauge dieser Abscheidung dampften wir zur Trockene ein und gewannen so den Rest des Glycyl-l-tyrosins. Das krystallisierte Glycyl-l-tyrosin läßt sich leicht aus Wasser unter Zusatz von Alkohol umkrystallisieren.

Das so erhaltene Glycyl-l-tyrosin erwies sich bei genauerer Untersuchung als nicht einheitlich. Schon der Zersetzungspunkt deutete auf ein Gemisch. Es fing gegen 120° an zu sintern und erst gegen 165° war das Produkt unter Aufschäumen völlig zersetzt. Unter dem Mikroskop zeigten sich verschiedene Krystallformen. Es ist uns geglückt, zwei verschiedene Körper zu isolieren. Sie unterscheiden sich durch ihren Krystallwassergehalt. Die eine Form erhält man, wenn man Glycyl-l-tyrosin in möglichst wenig heißem Wasser löst und dann der Lösung auf dem Wasserbade soviel kochenden Alkohol zusetzt, bis in der Hitze eine schwache Trübung bestehen bleibt. Beim Abkühlen und Kratzen mit dem Glasstab beginnt bald Krystallisation. Schon makroskopisch sind lanzettförmige, meist zu Gruppen vereinigte Krystalle erkennbar. Unter dem Mikroskop erwiesen sie sich als auf beiden Seiten zugespitzte, flache Blättchen. Nach einiger Zeit beobachtet man unter dem Mikroskop ein allmähliches Zerfließen der Krystalle und fast zu gleicher Zeit schießen zahlreiche feine Nadelchen hervor. Es handelt sich unzweifelhaft um eine Verwandlung der genannten Modifikation in die zweite Krystallart unter Wasseranziehung. Das zuerst erwähnte, im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknete Produkt schmilzt beim raschen Erhitzen gegen 185° (korr.) unter lebhaftem Aufschäumen. Der gebildete Schaum erstarrt und zersetzt sich erst gegen 295° (korr.).

Das im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknete Präparat verliert beim Trocknen im Vakuumtrockenapparat bei 105° Wasser.

0,3409 g Substanz verloren nach 18 stündigem Trocknen bei 105°
0,0239 g Wasser.

Berechnet für $C_{11}H_{14}N_2O_4 + 1 H_2O$:	Gefunden:
7,03 %	7,01 %

Das getrocknete Produkt schmolz zwischen 176 und 179° (korr.) unter Aufschäumen.

Eine weitere Krystallform erhält man, wenn man die verdünnte wässrige Lösung von Glycyl-l-tyrosin langsam verdunsten, oder aber eine heiß gesättigte wässrige Lösung sich abkühlen läßt. Im ersteren Fall erhält man derbe, pyramidenförmige Krystalle, im zweiten Fall lange, feine, meist zu Büscheln vereinigte Nadeln. Dieses letztere Produkt haben wir genauer untersucht. Das lufttrockene Präparat fängt bei 127° an zu sintern und schäumt gegen 129° (korr.) auf. Der entstandene Schaum wird fest und zersetzt sich erst gegen 295° (korr.). Beim Trocknen im Vakuumtrockenapparat bei 105° verliert der Körper annähernd 2 Moleküle Wasser. Das Wasser wird sehr langsam abgegeben.

0,1405 g Substanz verloren nach 20stündigem Trocknen bei 105° 0,0178 g an Gewicht.

Berechnet für $C_{11}H_{14}N_2O_4 + 2 H_2O$:	Gefunden:
13,13 % H_2O .	12,67 % H_2O .

Die Analyse des bei 105° bis zur völligen Gewichtskonstanz getrockneten Präparats gab folgende Zahlen:

0,1375 g Substanz gaben 0,2788 g CO_2 und 0,0738 g H_2O .

0,1295 g Substanz; 10,7 $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure (Kjeldahl).

Berechnet für $C_{11}H_{14}N_2O_4$:	Gefunden:
55,46% C, 5,88% H und 11,76% N.	55,23% C, 5,96% H und 11,60% N.

Das getrocknete Präparat fing beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 178° an aufzuschäumen und war gegen 180° völlig verändert.

Wir haben von dem aus heißem Wasser durch Abkühlen erhaltenen Produkt das Drehungsvermögen bestimmt. Wir erhielten von verschiedenen Präparaten folgende Werte $[\alpha]_{20}^D = + 46,5^{\circ}$, $+ 45,8^{\circ}$, $+ 46,9^{\circ}$. Wir werden später bei einer eingehenderen Untersuchung der erhaltenen Modifikationen von Glycyl-l-tyrosin das Drehungsvermögen noch genauer feststellen.

Um die Identität des krystallisierten Glycyl-l-tyrosins weiterhin zu beweisen, haben wir zunächst nach der früheren Methode dargestelltes amorphes Glycyl-l-tyrosin in Wasser gelöst, dann vorsichtig mit soviel Alkohol versetzt, bis eine leichte Trübung eintrat, und nun mit einem Kryställchen von Glycyl-l-tyrosin geimpft. Beim Stehen auf Eis erstarrte bald die ganze Masse.

Wir haben ferner von dem krystallisierten Glycyl-l-tyrosin, und zwar von dem aus Wasser + Alkohol erhaltenen, den salzsauren Ester in der üblichen Weise dargestellt. 2,5 g Glycyl-l-tyrosin wurden mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung unter Wasserkühlung eingeleitet. Zum Schluß wurde kurz aufgeköcht. Beim Abkühlen schied sich die Verbindung in farblosen Nadelchen ab. Durch Eindunsten über Kalk und Schwefelsäure ließ sich die Ausbeute noch verbessern. Erhalten wurden 90% der Theorie an reinem, gegen 245° (korr.) schmelzendem Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat.

0,3137 g Substanz : 10,2 ccm $\frac{1}{10}$ -n-AgNO₃.

Berechnet für C₁₃H₁₈O₄N₂ · HCl:

11,74% Cl

Gefunden:

11,53% Cl

Aus dem Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat stellten wir durch Auflösen in Alkohol, Einleiten von Ammoniak und sofortiges Abfiltrieren des ausgefallenen Chlorammons Glycyl-t-tyrosinanhydrid dar. Es fiel nach dem Aufkochen der Lösung bald aus. Zur Reinigung wurde das Produkt aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Es bildet meist zu fächerförmigen Gebilden verwachsene Nadeln, die unter Zersetzung gegen 297° (korr.) schmelzen. In schwach ammoniakalischer Lösung drehte das Anhydrid Natriumlicht sehr stark nach rechts. Eine ungefähre Bestimmung ergab $[\alpha]_{20}^D = +120^\circ$. Emil Fischer und W. Schrauth¹⁾ geben den Schmelzpunkt des Glycyl-l-tyrosinanhydrids gegen 295° (korr.) an und $[\alpha]_{20}^D = +124,3$ bis $+126,4^\circ$.

Das krystallisierte Glycyl-l-tyrosin ist im Gegensatz zum amorphen in Wasser recht schwer löslich. Es braucht zur völligen Lösung etwa 25 Teile Wasser. Aus gesättigter Lösung läßt es sich mit gesättigter Ammonsulfatlösung aussalzen, während beim amorphen Glycyl-l-tyrosin dies nicht der Fall ist. Im übrigen zeigt das krystallisierte Glycyl-l-tyrosin dieselben

¹⁾ Emil Fischer und Walther Schrauth, Aufspaltung von Diketopiperazinen und Dipeptide des Tyrosins. Liebigs Annalen, Bd. CCCLIV, S. 21, 1907.

Eigenschaften, wie das amorphe. Es wird durch Pankreassaft und andere proteolytische Fermente leicht gespalten.

Durch die Auffindung des krystallisierten Glycyl-l-tyrosins ist dessen Gewinnung in reinem Zustande außerordentlich erleichtert worden. Es ist nicht unbedingt nötig, bei der Gewinnung des Dipeptids aus dem Chloracetylkörper unter Einwirkung von Ammoniak das gebildete Chlorammon zu entfernen. Man dampft die ammoniakalische Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene ein und wiederholt das Abdampfen unter Zusatz von Alkohol, um möglichst alles freie Ammoniak zu entfernen. Nun löst man den Rückstand in möglichst wenig heißem Wasser auf und setzt vorsichtig bis zur beginnenden Trübung Alkohol zu. Nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glycyl-l-tyrosin, oft aber auch ganz spontan, tritt beim Abkühlen reichliche Krystallisation ein. Aus der Mutterlauge kann man durch Einengen noch weitere Mengen von chlorammonfreien Massen zur Abscheidung bringen. Die Gesamtausbeute an Glycyl-l-tyrosin, beträgt nach dieser Methode etwa 75—80% des angewendeten Chloracetyl-l-tyrosins. Will man die Ausbeute zu einer möglichst quantitativen gestalten, so empfiehlt es sich, an Stelle der sehr umständlichen Verwendung von Silbersulfat zur Entfernung des Chlors Silberacetat zu benützen. Auch hier wird zunächst die ammoniakalische Lösung des Dipeptids zur möglichst vollständigen Entfernung des freien Ammoniaks unter vermindertem Druck eingedampft. Dann wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit einem Überschuß von Silberacetat auf der Schüttelmaschine geschüttelt, dann die Lösung filtriert und das gelöste Silber mit Ammoniumchloridlösung gefällt. Das Filtrat von Chlorsilber enthält nunmehr nur noch das Dipeptid und Ammoniumacetat. Das Glycyl-l-tyrosin wird dann durch Krystallisation möglichst vollständig abgeschieden. Aus den Mutterlaugen erhält man den Rest des Dipeptids, indem man mit Alkohol fällt. Das in Alkohol leicht lösliche Ammonacetat bleibt in Lösung. Wir haben diese Methode auch mit Vorteil zur Darstellung des dl-Alanyl-glycins und dl-Alanyl-glycyl-glycins verwandt und sofort in guten Ausbeuten reine Produkte erhalten.

Was nun die Versuche selbst anbetrifft, so können wir

in betreff der allgemeinen Methodik auf die früheren analogen Untersuchungen verweisen. Eine Schwierigkeit entstand durch die vorhandenen großen Eiweißmengen, deren Koagulation, da wir, um keine Fehlerquellen in die angewandte Methode zu tragen, Zusätze vermeiden mußten, oft nicht sofort glückte. Besonders bei in Wasser schwer löslichen Polypeptiden und Spaltprodukten ist es durchaus notwendig das Eiweißkoagulum gründlich mit Wasser auszukochen und scharf abzupressen. Auch zeigte das l-Tyrosin und Glycyl-l-tyrosin die Neigung, mit dem Eiweiß zusammen, auszufallen. Eine weitere Schwierigkeit boten die im Plasma und Serum vorhandenen Salze und speziell die Chloride, die uns bei der Bestimmung des Chlorgehaltes der alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate störten. Wir verwendeten, um einen Überschuß an Natriumalkoholat zu vermeiden, stets etwas weniger davon, als wir berechnet hatten. Im übrigen wurde die enteiweißte Lösung stets unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert, dann die Ester mit etwas weniger als der berechneten Menge Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt und destilliert. Das Destillat dampften wir sofort nach Zusatz von wässriger Salzsäure zur Trockene ein und bestimmten den Rückstand. Die weitere Verarbeitung ergibt sich aus den mitgeteilten Versuchen. Im Destillationsrückstand suchten wir nach Anhydriden von Dipeptiden. Eine Ausnahme in der Verarbeitung der einzelnen Proben machten wir nur beim Glycyl-l-tyrosin, sofern Tyrosin abgeschieden war. Wir zentrifugierten dann die Lösung und bestimmten im Sediment das Tyrosin extra. Die Lösung selbst verarbeiteten wir, wie oben angegeben. Erwähnt sei noch, daß vor allem bei Verwendung von Glycyl-l-tyrosin oft flockige Abscheidungen auftreten, die man unter Umständen für Tyrosin halten könnte. Eine Untersuchung zeigt dann meist, daß Eiweiß vorliegt. Jedenfalls darf man sich nie mit der Feststellung einer erfolgten Abscheidung allein begnügen.

Serie I.

1. 3 g Glycyl-dl-leucin in 15 ccm Plasma gelöst und nach Zusatz von Toluol 3 Tage im Brutraum aufbewahrt. Gly-

kokoll und Leucin ließen sich nur in Spuren nachweisen. Wiedergewonnen wurden 2,3 g inaktives Glycyl-dl-leucinanhydrid und zwar in drei Krystallfraktionen. Die erste Abscheidung wog 0,2 g. F. = 243—246°. Die Lösung dieser Substanz erwies sich optisch als völlig inaktiv. Die zweite Krystallisation wog 0,5 g und war gleichfalls optisch inaktiv. F. = 240—246°. Aus der Mutterlauge gewannen wir noch 1,6 g eines bei 242° schmelzenden Körpers, der gleichfalls optisch inaktiv war. Es waren somit nur Spuren von Glycyl-dl-leucin gespalten worden.

2. 3 g dl-Alanyl-glycin + 15 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Bei der Destillation der Ester wurde nach dem Eindampfen des Destillates mit wässriger Salzsäure nur ein ganz geringer Rückstand erhalten. An Anhydrid gewannen wir roh 2,1 g. Es erwies sich als optisch inaktiv. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt aus Alkohol umkrystallisiert. Die erste hierbei erhaltene Fraktion von 1,2 g schmolz gegen 238°, die zweite Fraktion wog 0,5 g und zeigte F. gegen 208°. Die letzte Mutterlauge war sirupös. Auch hier war somit offenbar gar keine oder doch nur eine sehr geringe Hydrolyse erfolgt.

Serie II.

1. Angewandt 3 g Glycyl-dl-leucin + 30 ccm Plasma + Toluol. Der Versuch dauerte 3¹/₂ Tage. Glykokoll und Leucin waren nicht nachweisbar. An Anhydrid gewannen wir roh 2,0 g. Durch Umlösen aus Alkohol erhielten wir eine bei 240—250° schmelzende Fraktion von 1,2 g und 0,5 g eines Produktes, das gegen 233° schmolz. Die letzte Mutterlauge war sirupös. Beide Fraktionen erwiesen sich als optisch inaktiv. Eine Hydrolyse war somit offenbar nicht erfolgt.

2. 2,0 g Glycyl-dl-leucin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Glykokoll und Leucin mit Sicherheit nicht nachgewiesen. An Anhydrid isoliert: 0,8 g mit F. gegen 250° und 0,4 g eines niedriger schmelzenden Produkts. $\alpha = 0^\circ$.

3. 2,0 g Glycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Kein Glykokoll nachweisbar.

An Anhydrid isoliert: 0,6 g reines Produkt und 0,25 g weniger reines Glycinanhydrid.

4. 2,0 g Glycyl-dl-leucin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Leucin in Spuren erhalten, ferner 0,11 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°). An Anhydrid gewonnen: 0,4 g (F. gegen 250°), $\alpha = 0^\circ$ und 0,5 g eines unreineren Produktes, das nach links drehte und offenbar aktives Glycyl-dl-Leucinanhydrid enthielt. Es spricht alles dafür, daß eine geringe Hydrolyse stattgefunden hat.

5. 2 g Glycyl-glycin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Hier wurden die Ester nicht in Freiheit gesetzt, sondern die in Alkohol schwer löslichen Esterchlorhydrate durch Krystallisation getrennt. Erhalten wurde eine erste Krystallisation von 0,7 g vom F. = 186°. Es handelte sich offenbar um Glycyl-glycinesterchlorhydrat. Die zweite Fraktion schmolz zwischen 130 und 140° und wog ebenfalls 0,7 g, während die dritte Krystallfraktion schon von 100° an sinterte und bei 120—124° völlig geschmolzen war. Ihre Menge betrug 0,9 g. Fraktion 2 und 3 wurden vereinigt, nochmals mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert, die Ester in Freiheit gesetzt und destilliert. Wir erhielten 0,3 g reines Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°). Auch hier war offenbar Spaltung erfolgt.

Serie III.

1. 2,0 g Glycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Direkt isoliert 0,56 g. Glycyl-glycinesterchlorhydrat (F. = 183°). Nach der Destillation der Ester gewonnen 0,22 g Glykokollesterchlorhydrat (F. gegen 140°) und 0,72 g Glycinanhydrid in zwei Fraktionen, von denen die erstere, reinere gegen 210° anfang sich zu bräunen. Eine Spaltung war somit offenbar erfolgt.

2. 2,0 g Diglycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Die Trennung der einzelnen Produkte erfolgt durch fraktionierte Krystallisation der Esterchlorhydrate. Es wurden folgende Krystallisationen erhalten. 1. Aus 100 ccm Alkohol 0,75 g (F. = 219° (korr.)) = Diglycyl-glycinesterchlorhydrat. 2. Aus der eingeengten Mutterlauge

1,0 g Substanz. $F. = 182,5^{\circ}$ (korr.) = Glycyl-glycinesterchlorhydrat. 3. 0,35 g Krystalle vom $F. = 144^{\circ}$ (korr.) = Glykokollesterchlorhydrat und 4. 0,25 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$ [korr.]). Das angewandte Tripeptid war somit reichlich gespalten worden.

3. 2,0 g Triglycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Auch hier wurden die Esterchlorhydrate fraktioniert krystallisiert. Erhalten: 0,85 g eines von 200° an sinternden und gegen 210° schmelzenden Körpers. Er entspricht offenbar einem Gemisch des salzsauren Esters des unveränderten Triglycyl-glycins und desjenigen von Diglycyl-glycin. Die zweite Fraktion bestand aus 0,65 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat ($F. = 182^{\circ}$ [korr.]). Die beiden letzten Fraktionen enthielten den salzsauren Glykokollester ($F. = 144^{\circ}$ [korr.]). Seine Menge betrug nach dem Umkrystallisieren 0,50 g. Das angewandte Tetrapeptid war somit in bedeutendem Umfange gespalten worden.

4. 2,0 g dl-Leucyl-glycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Erhalten Spuren von Aminosäuren. An Rückstand, der offenbar den Ester des ungespaltenen Tripeptids enthielt, gewannen wir 2,45 g. Es scheint, daß das Leucyl-glycin-glycin wenig oder gar nicht angegriffen worden ist.

5. 2,0 g Glycyl-dl-alanin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert 0,07 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 138^{\circ}$) und 0,2 g salzsaures Alanin. Es handelt sich offenbar um d-Alanin, denn das zunächst gewonnene Gemisch von salzsaurem Glykokoll + salzsaurem Alanin drehte in wässriger Lösung deutlich nach rechts. Dem entspricht auch die Gewinnung von aktivem Anhydrid aus dem Destillationsrückstand. Es zeigte $[\alpha]_{20}^D = + 1,99^{\circ}$. Diese Drehung ist für Glycyl-l-alaninanhydrid etwas zu gering, was wohl auf die Beimengung von Racemkörper zurückzuführen ist. Von diesem Produkt wurden 0,6 g erhalten. $F.$ gegen 245° . Eine weitere Fraktion wog 0,42 g.

6. 2,0 g dl-Alanyl-glycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert 0,12 g Glykokollesterchlorhydrat ($F.$ gegen 140°) und 0,2 g salzsaures

d-Alanin, $[\alpha]_{20}^D = + 8,61^\circ$. Aus dem Destillationsrückstand gelang es nicht, krystallinische Produkte zur Abscheidung zu bringen. Es hinterblieben 1,60 g eines zähen Sirups.

7. 1,0 g Glycyl-l-tyrosin + 12,5 ccm Plasma + Toluol. Der Versuch dauerte 7 Tage. Es war nur eine geringe, flockige Abscheidung erfolgt. Es gelang nicht, aus der entweißten Flüssigkeit Tyrosin zur Abscheidung zu bringen, dagegen erhielten wir 0,65 g Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat (F. unter Zersetzung gegen 240°). Glykokoll war nicht nachweisbar.

8. 2 g dl-Alanyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert 0,12 g Glykokollesterchlorhydrat (F. 140°), 0,18 g salzsaures d-Alanin von $[\alpha]_{20}^D = + 8,70^\circ$ und ferner 0,25 g Alanyl-glycinanhydrid von $[\alpha]_{20}^D = + 3,58^\circ$ und 1,0 g inaktives Anhydrid (F. = 240°).

9. 2,0 g Glycyl-glycin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert: 2,35 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat (F. = $182,5^\circ$ [korr.]) und 0,12 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°).

10. 2,0 g Diglycyl-glycin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert: 0,85 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat (F. = $182,5^\circ$ [korr.]). 0,5160 g Substanz brauchten 26,1 ccm $1/10$ -Normal- AgNO_3 -Lösung = 17,93% Cl. Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ 18,0% Cl. Aus der Mutterlauge erhielten wir bei weiterem Einengen der alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate 0,25 g einer bei 144° (korr.) schmelzenden Substanz. 0,1812 g Substanz brauchten 13,0 ccm $1/10$ -Normal- AgNO_3 -Lösung = 25,45% Cl. Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2 \cdot \text{Cl}$ 25,42% Cl.

Aus der Mutterlauge gewannen wir noch 0,15 g unreines Glykokollesterchlorhydrat (F. = 135°).

Bei der Veresterung war ein Teil sofort wieder ausgefallen. Er wurde abfiltriert, mit kaltem Alkohol gewaschen und aus viel heißem Alkohol umkrystallisiert. Das reine Produkt wog 0,75 g. Es schmolz gegen 220° (korr.) und entspricht dem salzsauren Ester des unveränderten Diglycyl-glycins.

11. 2,0 g Triglycyl-glycin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Auch hier wurden zunächst die schwer löslichen salzsauren Ester abgetrennt. Die erste Krystallisation war offenbar ein Gemisch von salzsaurem Triglycyl-glycinester und von Diglycyl-glycinester. Es schmolz zwischen 195 und 215° und wog 0,65 g. Aus der Mutterlauge gewannen wir 0,45 g salzsauren Glycyl-glycinester (F. = 183,5° [korr.]) und ferner 0,50 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144° [korr.]).

12. 2,0 g dl-Alanyl-glycin + 25 ccm Serum + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert: 0,3 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°) und 0,3 g salzsaures d-Alanin ($[\alpha]_{20}^D = +10,24^\circ$). An Anhydriden wurden gewonnen eine erste Fraktion von 0,36 g (F. 236—240°) und eine zweite Fraktion von 0,43 g. Die erste Fraktion zeigte $[\alpha]_{20}^D = +4,42^\circ$.

Serie IV.

1. 2,0 g Diglycyl-glycin + 25 ccm Plasma + Toluol. Dauer des Versuches 7 Tage. Isoliert nach erfolgter Destillation der Ester: 0,7 g Glykokollesterchlorhydrat. Aus dem Destillationsrückstand konnte das zu erwartende Glycinanhydrid nicht in reinem Zustand abgeschieden werden.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Plasma und Toluol. Nach drei Tagen geringe flockige Fällung bemerkbar. Sie wurde abzentrifugiert und das Sediment in Wasser suspendiert und aufgeköcht. Es ging anscheinend nichts in Lösung und das Filtrat gab mit Millons Reaktion nach starker Konzentration nur eine leichte Rotfärbung. Das von der genannten Fällung befreite Filtrat wurde in siedendes Wasser eingegossen, das Gemisch noch etwa 5 Minuten im Sieden erhalten, dann filtriert und das nur ganz schwach opaleszierende Filtrat in einer Platinschale auf dem Wasserbade stark eingengt. Es erfolgte keine Ausscheidung von Tyrosin. Die starke konzentrierte Lösung wurde nun weiter unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft und der Rückstand mit Alkohol und gasförmiger trockener Salzsäure verestert. Die weitere Verarbeitung war die bei den übrigen Versuchen übliche. Glykokollesterchlorhydrat

wurde nicht mit Sicherheit nachgewiesen. Der Destillationsrückstand wog nach dem Verdampfen des Destillates mit wässriger Salzsäure 0,05 g. Glycyl-l-tyrosinanhydrid erhielten wir 0,6 g, nebst einem sirupösen Rückstand.

3. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Plasma und Toluol. Dieses Gemisch blieb 4 Tage im Brutraum. Die Verarbeitung war wie oben. Glykokoll und Tyrosin waren nicht nachweisbar. Bei der Veresterung schieden sich 0,85 g Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat vom Zersetzungspunkt gegen 240° ab.

4. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Plasma und Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Geringe flockige Ausscheidung. Isoliert: 0,08 Tyrosin, 0,06 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°) und 0,52 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid (F. = 295°).

5. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Plasma und Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage. Geringe Trübung. Isoliert: 0,04 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°), 0,48 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid (F. gegen 296°). Tyrosin selbst konnte nicht abgeschieden werden.

6. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Serum und Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage. Abscheidung von Krystallen. Isoliert: 0,10 g Tyrosin, 0,11 g Glykokollesterchlorhydrat von (F. = 144°) und 0,36 g reines Glycyl-l-tyrosinanhydrid (F. gegen 296°). Es verblieb noch ein Sirup, der starke Millonsche Reaktion gab.

7. 1 g Glycyl-l-tyrosin, 20 ccm Serum und Toluol. Dauer des Versuches 3 Tage. Schon am zweiten Tage zeigten sich krystallinische Abscheidungen. Ihre Menge nahm am dritten Tage nicht wesentlich zu. Isoliert: 0,09 g Tyrosin, 0,08 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°) und 0,45 g reines Glycyl-l-tyrosinanhydrid (F. gegen 295°).

Anmerkung: Für die Überlassung des Blutes sind wir Herrn Prof. Dr. Ostertag zu großem Dank verpflichtet, ebenso der h. Mediz. Fakultät der Kg. Friedrich-Wilhelms-Universität für die Gewährung von Mitteln aus der Gräfin-Bose-Stiftung.