

Über glutaminhaltige Polypeptide und zur Frage ihres Vorkommens im Eiweiß¹⁾.

Von

H. Thierfelder und E. von Cramm.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.)
(Der Redaktion zugegangen am 2. September 1918.)

Während asparaginhaltige Polypeptide schon vor mehr als zehn Jahren von Emil Fischer und Ernst Koenigs²⁾ dargestellt worden sind, waren solche, an deren Aufbau Glutamin beteiligt ist, bisher unbekannt. Wir haben einige bereitet, und zwar vier Dipeptide (Glycyl-d-glutamin, d-Alanyl-d-glutamin, l-Alanyl-d-glutamin, l-Leucyl-d-glutamin) und ein Tripeptid (Glycyl-d-glutaminyl-glycin).

Zu ihrer Gewinnung benutzten wir die von Emil Fischer angegebenen Verfahren. Für die Isolierung der halogenhaltigen Zwischenprodukte erwies sich die Extraktion mit Essigäther im Lindschen Extraktionsapparat sehr zweckmäßig. Es gelang auf diese Weise sofort, aus der Reaktionsflüssigkeit analysenreine Substanzen zu erhalten.

Das d-Glutamin wurde aus Runkelrübensaft nach den Angaben von E. Schulze und E. Bosshard³⁾ durch Fällung mit Mercurinitrat gewonnen. Wir haben auch die Fällung mit Quecksilberacetat und Natriumkarbonat, welche C. Neuberg und J. Kerb⁴⁾ für die Abscheidung von Aminosäuren

¹⁾ An den Anfängen dieser Arbeit war der frühere Assistent des Instituts, Herr Dr. Alfred Walther, beteiligt.

²⁾ Chem. Ber., Bd. 37, S. 4585 (1904) und Bd. 40, S. 2048 (1907).

³⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, Bd. 29 S. 295 (1883).

⁴⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 40, S. 498 (1912).

empfehlen, versucht, doch ist sie für diesen Zweck nicht so geeignet, da sie zu einem weniger reinen Präparat führt.

Von den vier Peptiden gibt nur das Tripeptid die Biuretreaktion, eine Fällung mit Phosphorwolframsäure außer ihm auch das Glycyl-glutamin.

Bei der Darstellung dieser Polypeptide verfolgten wir noch einen besonderen Zweck: wir wollten sie benutzen, um die Annahme, daß an dem Aufbau des Eiweißmoleküls Glutamin (und Asparagin) an Stelle von Glutaminsäure (und Asparaginsäure) beteiligt seien, auf ihre Richtigkeit weiter zu prüfen. Vor einigen Jahren fanden Thierfelder und Sherwin¹⁾ im Harn von Menschen, welche Phenyllessigsäure zu sich genommen hatten, Phenylacetyl-d-glutamin. Sie konnten weiter zeigen, daß diese Verbindung nicht erst sekundär aus Phenylacetylglutaminsäure durch Amidierung entsteht, denn eingeführte Phenylacetylglutaminsäure erschien unverändert²⁾ im Harn. Dadurch war das Glutamin, das bisher nur in den Pflanzen nachgewiesen worden war, als ein Stoffwechselprodukt des tierischen Körpers festgestellt. Über das Vorkommen des Glutamins im Eiweißmolekül sagen aber diese Ergebnisse nichts aus, denn das Glutamin, das die Verbindung mit Phenyllessigsäure eingeht, kann erst sekundär durch Eintritt der Aminogruppe in die Glutaminsäure entstanden sein.

Ein direkter Beweis für das Vorkommen von Glutamin im Eiweiß ist deswegen schwer zu erbringen, weil bei der Spaltung sowohl durch Säuren als durch Basen das Amid alsbald verseift und in die Säure übergeführt wird. Ob Glutamin durch Trypsin gespalten zu werden vermag, ist noch nicht bekannt, aber auch wenn es sich als widerstandsfähig

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 47, S. 2630 (1914); diese Zeitschr., Bd. 94, S. 1 (1915).

²⁾ In einem späteren Versuch, in dem 3 g Phenylacetylglutaminsäure als Natriumsalz in wässriger Lösung aufgenommen worden waren, erschien allerdings Phenylacetylglutamin im Harn. Dieses von dem früheren abweichende Ergebnis dürfte so zu erklären sein, daß die eingeführte Verbindung im Darm eine bakterielle Spaltung in Phenyllessigsäure und Glutaminsäure erfahren hat und das im Harn gefundene Phenylacetylglutamin das Produkt einer neuen Synthese ist.

erweisen sollte, dürfte der Versuch, mit Hilfe der tryptischen Verdauung die Frage zu entscheiden, an der Schwierigkeit, das Glutamin aus der Spaltungsflüssigkeit zu isolieren, scheitern.

Vermutet ist die Anwesenheit von Glutamin und Asparagin im Eiweiß schon lange, und zwar auf Grund der Bildung von Ammoniak bei der Hydrolyse. Osborne¹⁾ vermochte dieser Vermutung einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit zu geben. Er konnte zeigen, daß bei einer großen Zahl von Eiweißstoffen die Menge von Ammoniak und von Glutaminsäure + Asparaginsäure, welche bei der Spaltung entstehen, ziemlich genau einander entsprechen in dem Sinne, daß auf ein Molekül Ammoniak ein Molekül Glutaminsäure + Asparaginsäure kommt.

Um die Annahme noch weiter experimentell zu prüfen, haben wir untersucht, wie sich Eiweißstoffe, glutaminhaltige Polypeptide und Glutamin bei ganz unvollkommener Hydrolyse, bei der es nicht zur maximalen Ammoniakabspaltung kommt, verhalten, ob sich da ein Parallelismus in der Ammoniakbildung feststellen läßt.

Von demselben Gedankengange ausgehend hat schon Osborne experimentiert. Er ließ bei 20° C. 20%ige Salzsäure 17 Stunden auf Gliadin und auf Asparagin einwirken und fand, daß unter diesen Bedingungen von ersterem 39% der bei vollständiger Hydrolyse abspaltbaren Menge Ammoniak abgegeben wird, von letzterem nur 13%. Ein Parallelismus zeigte sich also hier nicht. Gegen diesen Versuch ist aber einzuwenden, daß Gliadin, ein Eiweißkörper, welcher bei vollständiger Hydrolyse 43—44% Glutaminsäure²⁾ und nur etwa 1% Asparaginsäure liefert, mit Asparagin verglichen wurde und nicht mit Glutamin. Asparagin ist aber schwerer verseifbar als Glutamin. Schon die Entdecker des Glutamins in den Pflanzen, E. Schulze und E. Bosshard³⁾, gaben an,

¹⁾ Osborne und Gilbert, Amer. Journ. of Physiol., Bd. 15, S. 333 (1906); Osborne, Leavenworth und Brautlecht, ebenda Bd. 23, S. 180 (1908/09).

²⁾ Osborne und Guest, Jl. of Biol. Chem., Bd. 9, S. 425 (1911).

³⁾ a. a. O.

daß, während Asparagin durch Kalkmilch in der Kälte nur sehr wenig angegriffen wird und auch bei der Destillation seiner wässerigen Lösung nur sehr wenig Ammoniak entwickelt, Glutamin unter der Einwirkung der genannten Reagentien schon beträchtlich zerfällt. Wir konnten feststellen, daß auch gegen Säuren das Asparagin weniger empfindlich ist als Glutamin: 20%ige Salzsäure spaltete bei niedriger Zimmertemperatur in 24 Stunden aus Glutamin 52,3% der maximalen Ammoniakmenge ab, aus Asparagin nur 19,8% (siehe S. 80).

Wir benutzten zu unseren vergleichenden Untersuchungen Gliadin, einige glutaminhaltige Polypeptide, welche, da sie Glutamin in der auch im Eiweiß vorkommenden Bindungsform enthalten, ein besseres Vergleichsobjekt darstellen als Glutamin und Glutamin. In einigen unserer Versuche gingen wir ebenso wie Osborne vor, d. h. wir ließen eine 20%ige Salzsäure bei 20° C. 18 bzw. 22 Stunden auf die Substanzen einwirken und bestimmten dann das abgespaltene Ammoniak (Versuche 2a und 2b S. 82); in anderen verwendeten wir kochende verdünnte Salzsäure, nachdem durch Vorversuche die Kochzeit ermittelt worden war, welche bei der benutzten Säurekonzentration noch nicht zur vollständigen Ammoniakabspaltung führt. Zur Lösung und Hydrolyse wurde ein 7% Salzsäure enthaltender wässriger Alkohol verwendet; die Erhitzung dauerte 6 Minuten. Zum Schluß wurde das abgespaltene Ammoniak bestimmt (Versuch 1 S. 81).

Die Resultate enthält die Tabelle auf Seite 61. Die bei Versuch 1 aufgestellten Zahlen sind Mittelwerte.

Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß Gliadin und die glutaminhaltigen Polypeptide sich recht gleichartig verhalten. Die beste Übereinstimmung zeigt der Versuch 2b. Die größeren Unterschiede in Versuch 1 erklären sich jedenfalls daraus, daß es unmöglich ist, die Bedingungen, unter denen hier gearbeitet wurde, völlig gleichmäßig zu gestalten. Auf jeden Fall sprechen die Ergebnisse weiter zu Gunsten der Annahme, daß Glutamin im Eiweißmolekül enthalten ist.

Glutamin zeigt, wie die Tabelle lehrt, ein abweichendes

Verhalten. Ein Unterschied zwischen Glutamin einerseits und glutaminhaltigen Polypeptiden sowie anderen Glutaminderivaten, in denen die Aminogruppe nicht frei ist, z. B. Phenylacetylglutamin, Chloracetylglutamin andererseits läßt sich auch in Bezug auf das Verhalten zu salpetriger Säure feststellen. Während in diesen die Säureamidgruppe so gut wie vollständig unangegriffen bleibt, reagiert sie beim Glutamin selbst vollständig mit salpetriger Säure (siehe S. 66); beim Asparagin ist das nicht der Fall. Wir kommen auf dieses Verhalten des Glutamins bei einer anderen Gelegenheit zurück.

	Abgespaltene Menge Ammoniak in % der maximalen Menge				
	Gliadin	Glyc.-glutam.-glyc.	Glyc.-glutamin	l-Leuc.-glutamin	Glutamin
Versuch 1 Salzsäure in der Hitze	50	50,8	48,5	48,1	88,8
Versuch 2a Salzsäure bei 20° C. 18 Stunden	37,5	38,3		39,0	56,1
Versuch 2b Salzsäure bei 20° C. 22 Stunden	39,0	38,9		38,8	57,7

Experimenteller Teil.

Synthese der glutaminhaltigen Polypeptide.

Chloracetyl-d-glutamin.

6 g fein pulverisiertes Glutamin wurden in eine Schüttelflasche, in der sich 42 ccm Normalnatronlauge (molek. Menge 41,07 ccm) befanden und die in Eiswasser stand, eingebracht und durch Schütteln gelöst. Dazu kamen 5,57 g Chloracetylchlorid (20% über molek. Menge) in ätherischer Lösung (Gesamtmenge der Lösung 60 ccm) und 60 ccm Normalnatronlauge in Einzelportionen von je 2 ccm. Nach jedem Zusatz von 2 ccm der ätherischen Lösung und 2 ccm Lauge wurde 40 Sekunden sehr stark geschüttelt und kurze Zeit in Eiswasser gekühlt. Die Flüssigkeit, welche dauernd alkalische

Reaktion zeigte, wurde nach Abtrennung der ätherischen Schicht im Scheidetrichter in einen Lindschen Apparat gebracht und nach Zufügen von 9 ccm fünffach normaler Salzsäure zur Entfernung der Chloressigsäure 5 Stunden mit Äther extrahiert. Die Menge des dabei in den Äther gehenden Stickstoffs war nur gering, sie betrug in verschiedenen Versuchen 1—3,8% des Gesamtstickstoffs. Die Flüssigkeit wurde nun in flacher Schale auf schwach erwärmtem Wasserbad unter einem Flügelventilator auf kleines Volumen gebracht und im Lindschen Apparat mit ein- oder zweimal erneuertem Essigäther extrahiert. Der Ersatz des Essigäthers durch neuen geschah, wenn Trübung auftrat. Nach etwa 10 Stunden war die Extraktion beendet und die anfängliche Linksdrehung der Lösung in eine Rechtsdrehung übergegangen. Aus dem Essigäther schied sich das Chloracetylglutamin in großen Kristalldrusen, die mikroskopisch aus Säulen bestehend erschienen, ab. Aus der eingeeengten Mutterlauge ließen sich weitere Kristallisationen gewinnen. Die Gesamtausbeute betrug im Mittel mehrerer Darstellungen 6,25 g, d. h. 68,4% der theoretischen Menge. Zum Umkristallisieren benutzten wir Essigäther, wobei die Abscheidung in haarfeinen, leicht gebogenen Nadeln erfolgt. Auch wasserfreier Alkohol läßt sich verwenden. Aus einer heißen 15%igen alkoholischen Lösung kristallisieren im Eisschrank bis zum nächsten Tag 65% aus. Die Substanz schmilzt, langsam erhitzt, bei 130—132° C. Sie löst sich in Wasser, Äthyl- und Methylalkohol, Aceton, nicht in Äther und Chloroform, schwer in heißem Essigäther. Sie wird im Vakuum über Schwefelsäure sehr schnell konstant und ist gar nicht hygroskopisch.

0,1762 g Substanz: 0,2447 g CO₂, 0,0779 g H₂O

0,1267 „ „ nach Pringsheim: 0,0801 g AgCl

0,1023 „ „ Kjeidahl: 9,08 ccm n/10-Säure = 12,72 mg N

0,0344 „ „ bei der Titration (Phenolphthalein): 1,54 ccm n/10-Lauge.

C₁₁H₁₁N₂O₄Cl. Ber.: 37,74% C 4,98% H 12,59% N 15,93% Cl M 222,57

Gef.: 37,88% C 4,95% H 12,43% N 15,64% Cl M 223,4

Für die Polarisation, welche in wässriger Lösung vorgenommen wurde, dienten zwei Präparate, von denen das

zweite aus der eingeeengten Mutterlauge des ersten und durch nochmalige Umkristallisation aus Essigäther gewonnen war.

1. 0,7134 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 8,5193 g. Spezifisches Gewicht 1,0287. Prozentgehalt 8,374. Drehung bei 16° im 2 dm-Rohr bei Natrium- und filtriertem Auerlicht $1,80^\circ$ nach links. Also $[\alpha]_D^{16^\circ} = -10,45^\circ$.

2. 0,7066 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,9651 g. Spezifisches Gewicht 1,0308. Prozentgehalt 8,871. Drehung bei 16° im 2 dm-Rohr bei filtriertem Auerlicht $1,89^\circ$ nach links. Also $[\alpha]_D^{16^\circ} = -10,33^\circ$.

Glycyl-d-glutamin.

Chloracetylglutamin wurde in der fünffachen Menge wässrigen Ammoniaks, welches 26,7% NH_3 enthielt, gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Beim Einengen der filtrierten Flüssigkeit zunächst über Schwefelsäure, dann im Vakuum über Schwefelsäure hinterblieb ein Sirup. Er wurde in Wasser gelöst und die Lösung mit Alkohol versetzt. Dabei schied sich ein Öl ab. Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol wurde wiederholt, bis das Ammoniumchlorid entfernt war. Das Öl ließ sich durch Behandeln mit wasserfreiem Alkohol in eine feste zerreibliche Masse überführen. Sie wurde in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit wasserfreiem Methylalkohol versetzt, bis eine beim Umschütteln nicht mehr verschwindende Fällung auftrat. Bringt man diese durch Erwärmen wieder in Lösung und läßt stehen, so scheidet sich das Dipeptid in schönen harten Kristallen ab.

Es enthält ein Molekül Kristallwasser, das im Phosphor-pentoxydvakuum bei gewöhnlicher Temperatur festgehalten und bei 105° erst nach etwa 24 Stunden abgegeben wird.

0,2216 g Substanz verloren 0,0189 g oder 8,53%; berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$: 8,15%.

Die so getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,0774 g Substanz: 0,1172 g CO₂ und 0,0495 g H₂O

0,0858 „ „ nach Kjeldahl: 12,7 ccm n/10-Säure.

C₇H₁₃N₃O₄ (203,134). Ber.: 41,35% C 6,45% H 20,69% N
Gef.: 41,30% C 7,16% H 20,74% N

Die kristallwasserhaltige und die kristallwasserfreie Substanz zeigen den gleichen Zersetzungspunkt. Er liegt bei langsamem Erhitzen bei 199—200° C.

Das Dipeptid löst sich leicht in Wasser und schmeckt schwach säuerlich. Seine wässrige (5—6%ige) Lösung färbt Lackmuspapier rot, gibt mit Sublimat und Gerbsäure keine Fällung, mit Phosphorwolframsäure (10%ig) einen Niederschlag, welcher zunächst beim Schütteln verschwindet, bei weiterem Zusatz beständig ist, im Überschuß sich wieder löst. Biuretreaktion negativ.

Für die optische Untersuchung, die mit wässriger Lösung vorgenommen wurde, dienten zwei Präparate verschiedener Darstellung.

1. 0,2970 g kristallwasserfreie Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,1249 g. Prozentgehalt 4,17. Spezifisches Gewicht 1,0157. Drehung im 2 dm-Rohr bei 19° und filtriertem Auerlicht — 0,2°. Also $[\alpha]_D^{19} = - 2,4^\circ$.

2. 0,3070 g kristallwasserfreie Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,3077 g. Prozentgehalt 4,20. Spezifisches Gewicht 1,0138. Drehung im 2 dm-Rohr bei 15° und filtriertem Auerlicht — 0,21°. Also $[\alpha]_D^{15} = - 2,47^\circ$.

Der gefundene Wert ist natürlich kein endgültiger. Die Bestimmung muß mit einer stärkeren Lösung wiederholt werden.

Bei der Untersuchung nach van Slyke wurde stets etwas mehr Stickstoff erhalten, als der primären Aminogruppe entspricht.

0,0489 g kristallwasserfreies Glycylglutamin geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 7,7 ccm Glas (21°, 736 mm) = 4,22 mg N = 8,63%. Der Prozentgehalt an primärem Aminostickstoff beträgt 6,9%.

Das Glycylglutamin verhält sich also wie andere Polypeptide, in denen Glycin die primäre Aminogruppe trägt.

Diese geben nach den Feststellungen von Abderhalden und van Slyke¹⁾ im Gegensatz zu den anderen bisher untersuchten, bei denen die gefundene Stickstoffmenge sehr gut mit der berechneten übereinstimmt, etwas zu viel Stickstoff. Abderhalden und van Slyke fanden, daß durch Multiplikation des erhaltenen Wertes mit dem Faktor 0,8 der richtige herauskommt. Das gilt auch für das Glycylglutamin, denn $8,63 \times 0,8$ ist 6,9.

Beim Glutamin reagiert auch der Stickstoff der Säureamidgruppe mit salpetriger Säure, wie schon E. Schulze und E. Bosshard²⁾ angaben und wir bestätigen können.

0,0215 g Glutamin geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 7,0 ccm Gas (17°, 729 mm) = 3,87 mg N = 18,0% N. Der Prozentgehalt an Gesamtstickstoff betrug bei dem benutzten Glutaminpräparat 18,20%.

Beim Asparagin reagiert nur die primäre Aminogruppe.

Chloracetyl-d-glutaminyglycinäthylester.

In eine weithalsige Schüttelflasche, welche in einer Kältemischung stand und 30 ccm destilliertes Acetylchlorid enthielt, wurden 3 g fein gepulvertes und durch ein Haarsieb getriebenes Chloracetylglutamin und darauf unter starkem Schütteln portionsweise 3,3 g frisch bereitetes und fein zerriebenes Phosphorpentachlorid eingetragen. Die Flasche wurde sofort verschlossen, in Eis verpackt und 9 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Das Absaugen des stets gelb gefärbten Reaktionsproduktes, das Auswaschen mit frisch destilliertem Acetylchlorid und wasserfreiem Petroläther geschah unter Ausschluß von Feuchtigkeit in dem von E. Fischer³⁾ angegebenen Apparat, das Trocknen im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid. Die Substanz, deren Menge in den einzelnen Versuchen zwischen 2,3 und 3,3 g schwankte, stellte nicht das reine Chloracetylglutaminychlorid dar. Der Gehalt an titrierbarem Chlor, welcher für das Chlorid 14,84% beträgt, schwankte in den Präparaten

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 74, S. 505 (1911).

²⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, Bd. 29, S. 305 (1883).

³⁾ Chem. Ber., Bd. 38, S. 605 (1905).

verschiedener Darstellung zwischen 7 und 15% und nahm im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid dauernd ab. Bei der großen Zersetzlichkeit der Substanz verzichteten wir auf die Reindarstellung und verwendeten das Material zur Gewinnung des Chloracetylglutaminylglycinäthylesters.

Zu dem Zweck wurde die ganze bei einem Versuch gewonnene Menge portionsweise und unter starkem Schütteln in eine durch Kältemischung abgekühlte Lösung von 4 g salzsaurem Glycinäthylester in 50 ccm wasserfreiem Chloroform eingetragen. Bei starkem Schütteln erfolgte zunächst Lösung und dann Abscheidung eines Niederschlages. Diese begann in manchen Fällen schon, ehe die Gesamtmenge eingetragen war. Nach längerem Stehen im Eisschrank wurde abgesaugt, mit wenig kaltem Chloroform gewaschen und im Vakuum-exsikkator getrocknet. Das Gewicht der trocken graugrünlischen Masse betrug meist 3–4 g, einmal 5,5 g. Sie ließ sich aus Wasser, Methyl- und Äthylalkohol sowie Aceton umkristallisieren. Am geeignetsten erwies sich wasserfreier Methylalkohol. Aus der heißen methyllkoholischen Lösung (1 Teil Substanz, 5 Teile Methylalkohol) schieden sich beim Erkalten Kristalle (Stäbchen und Nadeln) ab, die nach dem Absaugen und Trocknen eine weiße wollige Masse darstellten. Es handelte sich um den gesuchten Ester. Die Ausbeute war sehr gering. Aus 3 g Chloracetylglutamin wurden nur 0,34–0,7 g erhalten, also im Maximum etwa 17% der Theorie. Aus der Mutterlauge ließ sich wohl noch etwas gewinnen, aber so wenig, daß die Mühe sich nicht lohnte.

Die lufttrockene Substanz nahm im Vakuum nicht mehr an Gewicht ab.

0,0998 g Substanz: 0,1580 g CO₂ und 0,0552 g H₂O

0,0630 „ „ nach Kjeldahl: 5,95 cmm n₁₀-Säure.

C₁₁H₁₈N₂O₂Cl (307,634). Ber.: 42,91% C 5,90% H 13,66% N

Gef.: 43,18% C 6,20% H 13,23% N

Der Ester schmilzt bei 198° C. Er löst sich in heißem Wasser reichlicher als in kaltem, so daß man ihn aus Wasser gut umkristallisieren kann. Auch in Äthyl- und Methylalkohol und Aceton löst er sich in der Wärme.

Chloracetyl-d-glutaminyl-glycin.

Die Verseifung des Esters geht leicht vonstatten. 0,79 g wurden in 14 ccm Wasser heiß gelöst. Als beim Abkühlen gerade die Kristallisation begann, fügten wir 5,7 ccm Normalnatronlauge hinzu, kühlten sofort auf 0° C. ab und ließen bei Zimmertemperatur 30 Minuten stehen. Nun wurde die Flüssigkeit in den Lindschen Apparat gebracht und nach Zugabe von 6 ccm Normalsalzsäure mit Essigäther extrahiert, und zwar 28 Stunden bei zweimaligem Wechsel des Extraktionsmittels. Aus dem Essigäther schieden sich im Eisschrank flockig-gallerartige (mikroskopische Nadeln), zuweilen auch kristallinische Massen ab. Aus der eingeeengten Mutterlauge wurden weitere Abscheidungen erhalten. Die Ausbeute betrug 0,62 g oder 86% der Theorie. Zum Umkristallisieren der schon reinen Substanz diente wasserfreier Alkohol. Wählt man das Verhältnis so, daß auf 1 g Substanz etwa 55 T. Alkohol kommen, so scheiden sich 40% wieder aus, und zwar erfolgt die Abscheidung beim längeren Stehen in Form einer einzigen oder einiger weniger großen Kristalldrüsen. Mikroskopisch sieht man Säulen und Nadeln. Im Schwefelsäurevakuum wird sofort Gewichtskonstanz erreicht.

0,0853 g Substanz	:	0,1190 g CO ₂	und	0,0413 g H ₂ O	
0,0935 „	„	: 0,1309 „ CO ₂	„	0,0460 „ H ₂ O	
0,0508 „	„	nach Kjeldahl			: 5,4 ccm n ₁₀ -Säure
0,0744 „	„	„	„		: 7,9 „ n ₁₀ „
0,0508 „	„	bei der Titration (Phenolphthalein)		1,85 „	n ₁₀ „
0,0744 „	„	„	„	2,7 „	n ₁₀ „
C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₅ Cl (279,602). Ber.: 38,63% C 5,05% H 15,03% N M.-G. 279,6					
Gef.: 38,05% C 5,42% H 14,89% N „ 275,1					
„ : 38,18% C 5,50% H 14,88% N „ 275,5					

Die Substanz schmilzt bei langsamem Erhitzen bei 162 bis 163° C. Sie ist in Wasser leicht löslich.

Glycyl-d-glutaminyl-glycin.

0 25 g Chloracetyl-d-glutaminyl-glycin wurden in 1,5 ccm wässrigem Ammoniak (26,7%) gelöst und 10 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die in einer Schale zuerst

über Schwefelsäure, dann im Vakuum über Schwefelsäure verdunstende Flüssigkeit hinterließ einen kristallinen Rückstand. Er wurde in 4 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst, die Flüssigkeit, welche leicht opalesziert, mit Tierkohle geklärt, filtriert und das Filtrat mit der doppelten Menge absoluten Alkohols versetzt. Als bald begann die Kristallisation in Form feiner, zu dichten Büscheln vereinigter Nadeln. Die Ausbeute schwankte in verschiedenen Versuchen zwischen 0,19 g und 0,21 g, betrug also bis zu 89,4% der Theorie. Zum Umkristallisieren verfahren wir in derselben Weise. Aus einer 10%igen noch warmen wässerigen Lösung kristallisiert auf Zusatz von $\frac{2}{3}$ des Volumens absoluten Alkohols 86% wieder aus.

Für die Analyse wurde die Substanz bei 80° C. im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,0877 g Substanz : 0,1316 g CO₂ und 0,0515 g H₂O

0,0826 „ „ : 0,1258 „ CO₂ „ 0,0508 „ H₂O

0,0625 „ „ nach Kjeldahl: 9,68 ccm n/10-Säure.

C₉H₁₆N₄O₄ (260,168). Ber.: 41,51% C 6,20% H 21,54% N

Gef.: 40,92% C 6,57% H 21,70% N

„ : 41,54% C 6,88% H

Die Substanz zersetzt sich bei langsamem Erhitzen bei 201° C. Sie schmeckt ganz schwach salzig-säuerlich, löst sich in kaltem, reichlicher in heißem Wasser. Die wässerige (etwa 6%ige) Lösung färbt Lackmuspapier rot, gibt mit 10%iger Phosphorwolframsäurelösung einen Niederschlag, welcher zunächst beim Schütteln wieder verschwindet, bei weiterem Zusatz bestehen bleibt und sich im Überschuß wieder löst. Sublimat, Gerbsäure, Phosphormolybdänsäure, bas. Bleiacetat rufen keine Fällung hervor, ebensowenig eine gesättigte wässerige Ammoniumsulfatlösung. Schöne blauviolette Biuretreaktion.

Das Tripeptid dreht in wässriger Lösung nach links. Zu den Bestimmungen dienten Präparate verschiedener Darstellung:

1. 0,4200 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,3856. Spezifisches Gewicht 1,0215. Prozentgehalt 5,687. Drehung bei 19° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr — 3,30°. Also $[\alpha]_D^{19} = -28,40^\circ$.

2. 0,3516 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,9761 g. Prozentgehalt 4,41. Spezifisches Gewicht 1,0115. Drehung bei 18° und filtriertem Auerlicht im 2 dm-Rohr 2,54° nach links. Also $[\alpha]_D^{18} = -28,48^\circ$.

Bei der Untersuchung nach van Slyke verhält es sich wie das Glycylglutamin, indem auch hier zu viel Stickstoff gefunden wird.

0,0306 g des Tripeptids geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 4,0 ccm Gas (21°, 742 mm) = 2,21 mg N = 7,22%. Der Prozentgehalt an primärem Aminostickstoff beträgt 5,38.

Durch Multiplikation des erhaltenen Wertes mit dem Faktor 0,8 (siehe S. 66) erhält man auch hier wenigstens annähernd den berechneten, nämlich 5,8.

d- α -Brompropionyl-d-glutamin.

Das zur Darstellung dieses Körpers nötige d-Brompropionylchlorid war nach E. Fischer und O. Warburg¹⁾ aus d-Brompropionsäure, diese nach E. Fischer und K. Raske²⁾ aus l-Alanin und das l-Alanin³⁾ nach F. Ehrlich durch partielle Vergärung mit Hefe aus synthetischem Alanin gewonnen worden. Das l-Alanin zeigte in salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{18} = -10,1^\circ$, die d-Brompropionsäure drehte bei 17° im 1 dm-Rohr 46,25° nach rechts.

5 g fein gepulvertes Glutamin wurden in einer Schüttelflasche, in der sich 34,25 ccm Normalnatronlauge (molek. Menge) befanden und die in Eiswasser stand, eingebracht und durch Schütteln gelöst. Dazu kamen bei einer Temperatur von 10° C. 6,47 g Brompropionchlorid (10% über die molekulare Menge) und 42 ccm Normalnatronlauge in 26 Einzelportionen. Nach jedem Zusatz von 1,6 ccm der Lauge und 0,15 ccm des Chlorids (aus Büretten) wurde 40 Sekunden sehr stark geschüttelt. Ganz gegen Ende des Versuchs wurde die Reaktion sauer, so daß noch weitere 6 ccm Natronlauge zugegeben werden mußten. Die Flüssigkeit wurde nun im Lindschen

¹⁾ Liebig, Ann. der Chem., Bd. 340, S. 168 (1905).

²⁾ Chem. Ber., Bd. 39, S. 3995 (1907).

³⁾ Das l-Alanin wurde von dem Assistenten des Instituts, Herrn Dr. M. Baumann, dargestellt.

Apparat nach Zusatz von 10 ccm fünffachnormaler Salzsäure mit Essigäther im ganzen 16 Stunden extrahiert, bei zweimaligem Wechsel des Essigesters. Nach 8 Stunden war die Extraktion im wesentlichen beendet: die Menge der aus dem Essigäther zum Teil schon in der Wärme, zum Teil beim Abkühlen bis auf 0° C. auskristallisierten Substanz betrug 6,28 g. Aus dem Essigäther, der während der letzten 8 Stunden zur Extraktion gedient hatte, kristallisierten im Eisschrank noch 0,15 g aus. Aus der eingeengten Mutterlauge wurden noch 0,4 g erhalten. Alle diese 3 Fraktionen zeigten den gleichen Schmelzpunkt 152° C. Die Ausbeute betrug also 6,83 g = 71% der Theorie.

Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert und im Vakuum getrocknet. Gewichtskonstanz tritt sehr schnell ein.

0,1018 g Substanz	: 0,1283 g CO ₂ und 0,0462 g H ₂ O
0,1341 „	„ : 0,1674 „ CO ₂ „ 0,0569 „ H ₂ O
0,0845 „	„ nach Kjeldahl: 5,9 ccm n/10-Säure
0,1464 „	„ „ : 10,5 „ n/10 „
C ₈ H ₁₃ N ₂ BrO ₄ (281,044).	Ber.: 34,16% C 4,66% H 9,97% N
	Gef.: 34,37% C 5,08% H 9,78% N
	„ : 34,05% C 4,75% H 10,07% N

Die Substanz schmilzt bei 156—157° C., nachdem sie vorher ein feuchtes Ansehen angenommen hat. Sie löst sich in Wasser, Äthyl- und Methylalkohol, nur sehr wenig in Essigäther. 100 ccm wasserfreier Essigäther lösten von der fein pulverisierten Substanz bei 6—7stündigem Kochen am Rückflußkühler 0,59 g, von denen sich während mehrtägigen Stehens im Eisschrank 0,33 g wieder ausschieden.

Zur Polarisation dienten zwei Präparate, von denen das zweite aus der Mutterlauge des ersten erhalten war. Als Lösungsmittel benützten wir wasserfreien Methylalkohol.

1. 1,2510 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 11,0386 g. Spezifisches Gewicht 0,8495. Prozentgehalt 11,33. Drehung bei 19° im 2 dm-Rohr bei filtriertem Auerlicht 1,79° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{19} = +9,3^\circ$.

2. 0,6791 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,7555 g. Spezifisches Gewicht 0,8429. Prozentgehalt 10,05. Drehung

bei 19° im 2 dm-Rohr bei filtriertem Auerlicht $1,53^\circ$ nach rechts. Also $[\alpha]_D^{19^\circ} = + 9,03^\circ$.

d-Alanyl-d-glutamin.

1,5 g d- α -Brompropionyl-d-glutamin wurden mit 10 ccm wässriger Ammoniakflüssigkeit von 26,7% Ammoniak 1 Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde durch Filtration von einer geringen Trübung befreit, zuerst auf dem Wasserbad unter einem Ventilator, dann im Vakuum über Schwefelsäure eingeengt, der ammoniakfreie Rückstand in Wasser gelöst und mit Alkohol bis zur bleibenden Fällung versetzt. Im Eisschrank erfolgte reichliche Kristallisation. Die Ausbeute an halogenfreiem Dipeptid betrug 0,87 g = 75% der Theorie. Die Substanz wurde in 12 ccm Wasser gelöst und langsam mit 30 ccm wasserfreiem Alkohol versetzt, d. h. bis die Kristallisation begann. Im Eisschrank schieden sich glitzernde Kristalle in Form von Säulen und Prismen ab. Sie wurden fein pulverisiert und im Vakuumexsikkator bei 80° getrocknet.

0,0873 g Substanz : 0,1421 g CO_2 und 0,0591 g H_2O

0,0689 „ „ nach Kjeldahl : 9,4 ccm n_{10}° -Säure.

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ (217,154). Ber.: 44,21% C 6,96% H 19,35% N

Gef.: 44,39% C 7,58% H 19,11% N

Die Substanz schmilzt unter Zersetzung bei 222°C . Sie besitzt keinen ausgesprochenen Geschmack. Sie löst sich leicht in Wasser, nicht in absolutem Alkohol.

Die wässrige Lösung rötet Lackmuspapier; sie gibt (1%ige Lösung) keine Biuretreaktion und keine Fällung mit Sublimat und mit Phosphorwolframsäure.

Zur Polarisation (in wässriger Lösung) dienten zwei Präparate verschiedener Darstellung.

1. 0,7909 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,6925 g. Spezifisches Gewicht 1,0341. Prozentgehalt 10,28. Drehung bei 18° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr + $1,98^\circ$. Also $[\alpha]_D^{18^\circ} = + 9,3^\circ$.

2. 0,6438 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,9982 g. Prozentgehalt 9,2. Spezifisches Gewicht 1,0413. Drehung

bei 18° und filtriertem Auerlicht im 2 dm-Rohr $1,75^\circ$ nach rechts. Also $[\alpha]_D^{18} = + 9,12^\circ$.

Mit salpetriger Säure nach van Slyke reagiert nur die primäre Aminogruppe.

0,0330 geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 4,0 ccm Gas ($19,5^\circ$, 742 mm) = 2,227 mg N = 6,75 % N. Der Prozentgehalt an primärem Aminostickstoff beträgt 6,45.

l- α -Brompropionyl-d-glutamin.

Das zur Synthese dieser Verbindung erforderliche l-Brompropionylchlorid war vom d-Alanin aus über die l-Brompropionsäure in derselben Weise dargestellt worden, wie die entsprechende d-Verbindung.

Das d-Alanin, aus Seide gewonnen, zeigte die spez. Drehung $+ 9,35^\circ$, die l-Brompropionsäure, welche in einer Ausbeute von 72,6% erhalten wurde, drehte im 1 dm-Rohr bei 17° und Natriumlicht $- 41,6^\circ$. Die Ausbeute an dem Chlorid betrug 88,7% der Theorie.

Die Kuppelung und die Isolierung mittelst Essigäther geschah in der bei der Darstellung des d-Brompropionylglutamins beschriebenen Weise. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Die Kristallisation aus Essigäther erfolgte in großen z. T. zu Rosetten zusammenliegenden Nadeln.

Zur Analyse wurde die aus Wasser umkristallisierte Substanz benutzt, welche im Vakuum über Schwefelsäure schnell konstantes Gewicht annahm.

0,1095 g Substanz: 0,1361 gr CO_2 und 0,0472 g H_2O
 0,1300 „ „ nach Kjeldahl: 9,36 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure.
 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{BrO}_4$ (281,044) Ber.: 34,16% C 4,66% H 9,97% N
 Gef.: 33,90% C 4,82% H 10,09% N

Die Substanz schmilzt bei 132°C . Sie löst sich in Wasser, Äthyl- und Methylalkohol, nur wenig in Essigäther.

Zur Polarisation dienten zwei aus Essigäther kristallisierte Präparate, von denen das zweite aus der Mutterlauge des ersten erhalten war. Als Lösungsmittel wurde Methylalkohol benutzt.

1. 1,0606 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,8617 g. Spezifisches Gewicht 0,871. Prozentgehalt 15,46. Drehung bei 19° im 2 dm-Rohr bei Natriumlicht $4,69^\circ$ nach links. Also $[\alpha]_D^{19} = - 17,42^\circ$.

2. 0,3404 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,2494 g. Spezifisches Gewicht 0,8221 g. Prozentgehalt 5,45. Drehung bei 19° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr $1,55^\circ$ nach links. Also $[\alpha]_D^{19^\circ} = -17,30^\circ$.

Für die aus Wasser umkristallisierte Substanz wurde bei derselben Konzentration zuweilen auch ein solcher Wert erhalten, in andern Fällen aber ein niedrigerer ($[\alpha]_D = -16,4^\circ$), welcher manchmal auch bei wiederholter Umkristallisation aus Wasser sich nicht änderte (in drei aufeinanderfolgenden Kristallisationen betrug $[\alpha]_D -16,4^\circ$, $-16,64^\circ$, $-16,43^\circ$), in anderen Fällen aber abnahm. Eine befriedigende Erklärung für dieses Verhalten können wir nicht geben.

l-Alanyl-d-Glutamin.

Das für die Darstellung benutzte l-Brompropionylglutamin zeigte die spez. Drehung $-16,4^\circ$. Sie geschah ebenso wie beim d-Alanylglutamin beschrieben. Während das d-Dipeptid außerordentlich leicht kristallisierte, erfolgte die Kristallisation des l-Dipeptids sehr langsam und unvollständig. Auch beim Umkristallisieren ergab sich dieselbe Schwierigkeit, so daß die Ausbeute an reiner Substanz im besten Fall nur 22% der theoretischen betrug. Die Kristallisation aus der mit Alkohol versetzten wässerigen Lösung erfolgte in kleinen der Glaswand anhaftenden Warzen oder in lockeren Nadeln. Im Vakuum über Schwefelsäure wird sehr schnell konstantes Gewicht erreicht.

0,0698 g Substanz: 0,1127 g CO_2 und 0,0424 g H_2O
 0,0381 „ „ nach Kjeldahl: 5,3 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure.
 $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ (217,154) Ber.: 44,21% C 6,96% H 19,35% N
 Gef.: 44,03% C 6,80% H 19,49% N

Die Substanz schmilzt bei $212-213^\circ\text{C}$. Sie besitzt keinen ausgesprochenen Geschmack, löst sich leicht in Wasser, nicht in absolutem Alkohol. Sie rötet Lackmuspapier und gibt keine Biuretreaktion.

Sie dreht in wässriger Lösung links. 0,3563 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,3270 g. Prozentgehalt 5,63.

Spezifisches Gewicht 1,0163. Drehung bei 15° und filtriertem Auerlicht im 2 dm-Rohr $2,3^\circ$ nach links. Also $[\alpha]_D^{15} = -20,1^\circ$.

α -Bromisocapronyl-d-glutamin.

5 g fein pulverisiertes Glutamin wurden in einer in Eis stehenden Stöpselflasche mit der molekularen Menge Normalnatronlauge (34,2 ccm) zusammen- und durch Schütteln in Lösung gebracht. Dazu kam bei einer Temperatur von 10°C . 9,2 g inaktives Bromisocapronylbromid (4% über molekulare Menge) und 36 ccm Normalnatronlauge, und zwar wurden diese Mengen aus Büretten in 18 Einzelportionen zugefügt, jedesmal 0,3 ccm des Bromids und 1,94 ccm der Lauge. Nach jedem Zusatz wurde 40 Sekunden sehr stark geschüttelt. Bei dem nun erfolgenden allmählichen Zusatz von 36 ccm Normalsalzsäure trat ein Niederschlag auf, der zunächst beim Umschütteln verschwand, aber nach Zufügen von etwa 24 ccm bleibend wurde. Der Niederschlag verdichtete sich allmählich zu einer öligen Masse, die sich am Boden absetzte und über Nacht zum größten Teil kristallisierte (in einem zweiten Versuch erfolgte keine Kristallisation). Die abgegossene Flüssigkeit, deren Menge 140 ccm betrug und die $2,37^\circ$ nach links drehte, wurde 6 Stunden im Lindschen Apparat mit Essigäther extrahiert. Nach dieser Zeit war sie optisch inaktiv und enthielt nur noch 86,6 mg Stickstoff. Aus dem Essigäther schieden sich im Eisschrank 3,87 g amorpher Substanz ab, aus den eingengten Mutterlaugen nochmals 0,91 g und aus der Mutterlauge dieser Ausscheidung nach weiterem Einengen 1,07 g, ebenfalls amorph. Im ganzen wurden also 8,85 g erhalten, d. h. 80% der theoretischen Ausbeute, welche 11,06 g beträgt. Da von den beiden für die Kuppelung benutzten Substanzen die eine optisch aktiv, die andere ein inaktives Gemisch von zwei optischen Antipoden war, so mußte bei dieser 50% der Theorie überschreitenden Ausbeute ein Gemisch von zwei stereoisomeren Formen vorliegen, deren Trennung wir versucht haben.

Von den erwähnten vier Fraktionen wurden je 0,2548 g in 5,3 ccm Methylalkohol gelöst und im 2 dm-Rohr polarisiert. Die Drehung betrug bei der ersten Fraktion $+0,31^\circ$, bei der

zweiten — $1,3^{\circ}$, bei der dritten — $0,85^{\circ}$ und bei der vierten — $1,36^{\circ}$. Durch Umkristallisieren der ersten Fraktion wurden stärker rechts drehende Kristallisationen erhalten und auch aus den amorphen Fraktionen ließen sich in kleinen Mengen rechtsdrehende Kristallisationen gewinnen. Da also die Fällung der Reaktionsflüssigkeit mit Salzsäure nicht zu einem einheitlichen Körper führte und da die Hauptmenge des Reaktionsproduktes erst durch Extraktion mit Essigäther isoliert werden konnte, so haben wir in den weiteren Versuchen die Reaktionsflüssigkeit sofort in den Lindschen Apparat gebracht und nach Zusatz der nötigen Menge Salzsäure 7—8 Stunden mit Essigäther extrahiert. Während mehrtägigen Stehens bildeten sich in dem Essigäther zunächst kristallinische und dann amorphe Abscheidungen und in der eingeeengten Mutterlauge entstanden weitere amorphe. Durch Umkristallisieren aus Essigäther gelang es, von amorphen Beimengungen ganz freie Kristallisationen zu gewinnen (aus 5 g Glutamin 2—2,5 g). Die Hauptmenge aber wurde amorph erhalten, und zwar in Form von weißen Krusten und gallertartigen Massen, die sich nach dem Trocknen zu einem feinen weißen Pulver zerreiben ließen.

1. Kristallisierte Substanz. Sie drehte von Anfang an rechts in methyllalkoholischer Lösung. Die Drehung nahm beim Umkristallisieren aus Wasser zu und wurde nach der zweiten Umkristallisation konstant. Durch Umkristallisieren aus Essigäther kamen wir zu einer noch stärker drehenden Substanz, die bei weiterem Umkristallisieren ihre Drehungsstärke behielt.

Für die Analyse wurde im Schwefelsäurevakuum getrocknet.

0,1213 g Substanz:	0,1807 g CO_2 und 0,0675 g H_2O
0,1094 „ „	nach Kjeldahl: 6,49 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure
0,0419 „ „	bei der Titration (Phenolphthalein): 1,31 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure
$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$ (323,092). Ber.:	40,86% C 5,93% H 8,67% N M.-G. 323,1
	Gef.: 40,63% C 6,23% H 8,31% N „ 320

Die Substanz schmilzt gegen 150° unter Gelbfärbung, nachdem sie vorher „feucht“ geworden ist. Sie löst sich leicht in Äthyl- und Methylalkohol, wenig in kaltem, gut in

heißem Wasser, aus dem sie in schönen derben, dichte Aggregate bildenden Prismen kristallisiert. In heißem Essigäther löst sie sich reichlich. Von 9,5 g, die in 200 ccm kochendem wasserfreien Essigäther gelöst waren, schieden sich beim Erkalten 7,69 wieder ab, und zwar in denselben Formen.

Für die Polarisation diente eine methylalkoholische Lösung zweier Präparate verschiedener Darstellung.

1. 0,4531 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 7,8896 g. Spezifisches Gewicht 0,8227. Prozentgehalt 5,743. Drehung bei 10° im 2 dm-Rohr bei filtriertem Auerlicht $1,97^\circ$ nach rechts. Also $[\alpha]_D^{10} = +20,8^\circ$.

2. 0,5094 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 8,4774 g. Spezifisches Gewicht 0,8220. Prozentgehalt 6,01. Drehung bei 25° und filtriertem Auerlicht im 2 dm-Rohr $2,03^\circ$ nach rechts. Also $[\alpha]_D^{25} = +20,55^\circ$.

Diese Substanz stellt, wie sich später (S. 78) zeigte, das reine d- α -Bromisocapronyl-d-glutamin dar.

2. Amorphe Substanz. Sie wird sehr langsam, erst nach etwa einer Woche, im evakuierten Schwefelsäureexsikkator konstant.

Zur Analyse dienten zwei verschiedene Präparate.

Präparat 1.

0,1533 g Substanz: 0,2292 g CO_2 und 0,0850 H_2O
 0,0976 „ „ nach Kjeldahl: 5,7 ccm $\text{n}/_{10}$ -Säure.
 0,1304 „ „ „ Pringsheim: 0,0748 g $\text{AgBr} = 0,0318$ g Br
 0,0976 „ „ bei der Titration (Phenolphthalein): 3,0 ccm $\text{n}/_{10}$ -Säure.

Präparat 2.

0,1153 g Substanz: 0,1722 g CO_2 und 0,0620 g H_2O
 0,1054 „ „ nach Kjeldahl: 6,5 ccm $\text{n}/_{10}$ -Säure.
 0,1253 „ „ „ Pringsheim: 0,0709 g $\text{AgBr} = 0,0302$ g Br
 0,1054 „ „ bei der Titration: 3,2 ccm $\text{n}/_{10}$ Säure.
 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$. Ber.: 40,86% C 5,93% H 8,67% N 24,74% Br M.-G. 323,1
 Gef.: 40,78% C 6,20% H 8,18% N 24,39% Br „ 325
 „ 40,73% C 6,02% H 8,64% N 24,11% Br „ 329

Beide Präparate drehen in methylalkoholischer Lösung links, aber untereinander verschieden und beide schwächer nach

links als das kristallisierte nach rechts. In ihnen liegen jedenfalls Gemische von d- und l- α -Bromisocapronyl-glutamin vor.

Wir haben versucht, von dieser Substanz Salze darzustellen. Kristallisiert erhielten wir nur das Lithiumsalz.

0,1228 g gaben 0,0241 g $\text{Li}_2\text{SO}_4 = 0,0031$ g Li.

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{BrLi}$ (329,1). Ber.: 2,13% Li.

Gef.: 2,49% Li.

d- α -Bromisocapronyl-d-glutamin.

Das zur Darstellung dieses Körpers erforderliche d- α -Bromisocapronylchlorid war nach E. Fischer¹⁾ aus d- α -Bromisocapronsäure und diese²⁾ aus Formyl-d-leucin gewonnen, welches aus racemischem Leucin nach E. Fischer und O. Warburg³⁾ und E. Fischer⁴⁾ bereitet worden war. Die spezifische Drehung der d-Bromisocapronsäure betrug + 40,45°. Das Chlorid destillierte bei 0,3 mm Druck bei 40 - 42°.

6 g fein gepulvertes Glutamin wurden in einer Schüttelflasche, in der sich 41 ccm Normalnatronlauge (molekulare Menge) befanden und die in Eiswasser stand, eingebracht und durch Schütteln gelöst. Dazu kamen bei einer Temperatur von 10° C. 9,26 g d-Bromisocapronylchlorid (5-6% über molekulare Menge) und 46 ccm Normalnatronlauge in 21 Einzelportionen. Nach jedem Zusatz von 0,3 ccm Chlorid und 2,1 ccm Lauge wurde 40 Sekunden stark geschüttelt. Die alkalische Reaktion ging zu allerletzt in eine saure über. Die Flüssigkeit wurde in den Lindschen Apparat gebracht, mit 9 ccm fünf-fach normaler Salzsäure versetzt, wobei Niederschlag entstand, und mit Essigäther drei Stunden extrahiert. Der Essigäther blieb im Eisschrank zunächst klar, auf Reiben mit dem Glasstab erfolgte aber sofort reichliche Kristallisation, die nach mehreren Tagen abgesaugt wurde und getrocknet 9,77 g wog = 77,5% der Theorie. Aus wasserfreiem Essigäther umkristallisiert zeigte die Substanz denselben Schmelzpunkt (gegen 150° C.) und annähernd dieselbe Drehung wie die rechtsdrehende kristallisierte Fraktion, die wir aus dem Gemenge der beiden

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 39, S. 2930 (1906).

²⁾ E. Fischer, Chem. Ber., Bd. 39, S. 2929 (1906).

³⁾ Chem. Ber., Bd. 38, S. 3997 (1905).

⁴⁾ Chem. Ber., Bd. 39, S. 2928 (1906).

optisch isomeren Bromisocapronylglutamine, zu deren Darstellung inaktives Bromisocapronylbromid benutzt worden war, erhalten hatten (S. 76).

Die Polarisation geschah in methylalkoholischer Lösung.

0,5210 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 8,5377 g. Spezifisches Gewicht 0,8198. Prozentgehalt 6,10. Drehung bei 17° im 2 dm-Rohr bei Natriumlicht + 2,03°. Bei filtriertem Auerlicht war die Ablesung die gleiche. Also $[\alpha]_D^{19} = + 20,29^\circ$.

Die Drehung änderte sich nach dem Umkristallisieren nicht.

l-Leucyl-d-glutamin.

4 g d- α -Bromisocapronyl-d-glutamin wurden mit 25 ccm wässriger Ammoniakflüssigkeit (26,7% NH₃) eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Die klare Flüssigkeit wurde auf schwach erwärmtem Wasserbad unter dem Ventilator eingengt, die ausgeschiedene Kristallmasse abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Aus der eingengten Mutterlauge erfolgte eine weitere Kristallisation. Gesamtausbeute 2 g = 62,5% der Theorie. Das Produkt wurde fein zerrieben und in der hundertfachen Menge kochenden Wassers gelöst. Aus der Lösung schied sich auf Zusatz des gleichen Volumens 96%igen Alkohols das Leucylglutamin quantitativ wieder ab, und zwar in feinen geschwungenen sternförmig angeordneten Nadeln oder auch in geraden Stäbchen. Abgesaugt und getrocknet bildet es eine glänzende filzartige, leicht zerreibliche Masse, die im Vakuum über Schwefelsäure schnell konstantes Gewicht annahm.

0,0896 g Substanz	:	0,1669 g CO ₂	und	0,0674 g H ₂ O
0,0961 „	„	: 0,1804 „ CO ₂	„	0,0707 „ H ₂ O
0,0420 „	„	nach Kjeldahl	:	4,94 ccm n/10-Säure
0,0419 „	„	„	„	: 4,80 „ n/10 „

C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₄ (259,194).	Ber.:	50,93% C	8,17% H	16,22% N
	Gef.:	50,80% C	8,42% H	16,32% N
	„	51,20% C	8,23% H	16,05% N

Die Substanz schmilzt bei langsamem Erhitzen bei 235 bis 236° C. Sie hat keinen ausgesprochenen Geschmack. Sie

löst sich nur wenig in kaltem Wasser (etwa zu 0,7%), reichlicher in heißem, nicht in Alkohol, sehr leicht in Alkalien und Säuren. Die wässrige Lösung färbt Lackmuspapier rot, gibt mit Sublimat und Phosphorwolframsäure keine Fällungen. Biuretreaktion negativ.

Die Lösung in verdünnter Salzsäure zeigt Rechtsdrehung. 0,3581 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung, welche auf 1 Molekül Substanz $1\frac{1}{2}$ M. HCl enthält, 9,6491 g. Spezifisches Gewicht 1,0132. Prozentgehalt 3,711. Drehung bei 18° im 2 dm-Rohr bei filtriertem Auerlicht $+ 0,95^\circ$. Also $[\alpha]_D^{18} = + 12,6^\circ$.

Mit salpetriger Säure nach van Slyke reagiert die primäre Aminogruppe.

0,0487 Leucylglutamin geben nach van Slyke bei 10 Minuten langem Schütteln 5,1 ccm Gas (20° , 742 mm) = 2,833 mg N = 5,82%. Der Prozentgehalt an primärem Aminostickstoff beträgt 5,40.

Ammoniakabspaltung aus Asparagin und Glutamin durch Salzsäure bei Zimmertemperatur.

Das abgespaltene Ammoniak wurde hier wie in den folgenden Versuchen nach Krüger-Reich¹⁾ und Schittenhelm²⁾ (unter Benutzung von Natriumchlorid, Natriumkarbonat und Alkohol) im Vakuum abdestilliert und titrimetrisch bestimmt. Die beiden Amide gaben bei diesem Verfahren kein Ammoniak ab.

Aus 0,1731 g kristallwasserfreien Asparagins, welche in 10 ccm 20%iger Salzsäure gelöst waren, wurden in 24 Stunden bei niedriger Zimmertemperatur 4,26 mg = 2,46% Ammoniak abgespalten, aus 0,2006 g Glutamin unter denselben Bedingungen 11,41 mg = 5,7%. Die erhaltene Menge beträgt bei Asparagin 19,8% der maximalen (12,40%), bei Glutamin 52,3% der maximalen (10,90%)³⁾.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 39, S. 165 (1903).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 39, S. 73 (1903).

³⁾ Theoretisch ist die maximale Menge Ammoniak aus wasserfreiem Asparagin 12,90%, aus Glutamin 11,67%. Die von uns benutzten Prä-

Ammoniakabspaltung aus Gliadin, glutaminhaltigen Polypeptiden und Glutamin unter den gleichen Bedingungen bei unvollständiger Hydrolyse.

Versuch 1: Da die Versuche ganz gleichmäßig durchgeführt werden sollten, mußten wir ein für alle Substanzen geeignetes Lösungsmittel benutzen. Wir verwendeten 50%igen Alkohol, in dem sich Gliadin ohne weiteres, die Polypeptide und Glutamin sofort auf Zusatz von Salzsäure lösen.

Die bis zum konstanten Gewicht getrocknete, abgewogene Substanzmenge wurde also in einem Kölbchen mit genau 8 ccm 50%igen Alkohols übergossen, in Lösung gebracht bzw. fein verteilt, die Lösung mit 4 ccm 20%iger Salzsäure (aus der Bürette) versetzt und genau 6 Minuten am Rückflußkühler erhitzt. Nachdem die Flüssigkeit mit voller Flamme zum Sieden gebracht worden war (1 Minute), wurde sie mit kleiner Flamme 5 Minuten in lebhaftem Kochen erhalten. Sie wurde dann in einen Rundkolben übergeführt, bei 0° mit Natronlauge bis zur schwachsauren Reaktion versetzt und der Ammoniakbestimmung unterworfen.

Die Ausführung aller Versuche war bis ins einzelne die gleiche; Kölbchen, Brenner, Dreifuß, Drahtnetz waren immer dieselben.

0,1766 g Gliadin	gaben 4,48 mg	2,54% NH ₃	} 2,55% = 50% der maximalen Menge ¹⁾ .
0,1793 „ „	„ 4,60 „	= 2,57% „	
0,1010 „ Glyc.-glutam.-glyc. „	3,41	= 3,38% „	} 3,33% = 50,8% der maximalen Menge.
0,1002 „ „	3,29 „	= 3,28% „	
0,2031 „ Glyc.-glutam. „	8,35 „	= 4,11% „	} 4,07% = 48,5% der maximalen Menge.
0,2013 „ „	8,12 „	= 4,03% „	
0,2015 „ 1-Leuc.-glutam. „	6,30 „	= 3,13% „	} 3,16% = 48,1% der maximalen Menge.
0,1010 „ „	3,24 „	= 3,21% „	
0,0980 „ „	3,07 „	= 3,13% „	

parate gaben aber nur 12,40 bzw. 10,90%, offenbar deswegen, weil sie eine kleine Menge Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure enthielten.

¹⁾ Das Gliadin gab bei völliger Hydrolyse in zwei Versuchen 5,08 und 5,12%, im Mittel also 5,10% NH₃. Die maximale Ammoniakabspaltung wird schon nach 7 Minuten langem Kochen mit 20%iger Salzsäure erreicht.

0,2045 g Glutamin	gaben 19,93 mg = 9,75% NH ₃	} 9,68% = 88,8% der maximalen Menge ¹⁾ .
0,2028 „ „	„ 19,59 „ = 9,66% „	
0,2017 „ „	„ 19,42 „ = 9,63% „	

Versuch 2: Die abgewogenen Substanzmengen wurden in 5 ccm 20%iger Salzsäure gelöst, die Lösungen nach 18- bzw. 22stündigem Stehen bei 20° C. durch langsamen Zusatz von Natronlauge bei 0° schwach sauer gemacht und der Ammoniakbestimmung unterworfen.

a) Nach 18 Stunden:

0,0892 g Gliadin	gaben 1,7 mg = 1,91% NH ₃ = 37,5%	} der maximalen Menge.
0,0999 „ Glyc.-glutam.-glyc.	„ 2,51 „ = 2,51% „ = 38,4%	
0,0998 „ l-Leuc.-glutam.	„ 2,55 „ = 2,56% „ = 39,0%	
0,0997 „ Glutamin	„ 6,13 „ = 6,15% „ = 56,4%	

b) Nach 22 Stunden:

0,1025 g Gliadin	gaben 2,04 mg = 1,99% NH ₃ = 39,0%	} der maximalen Menge.
0,1002 „ Glyc.-glutam.-glyc.	„ 2,56 „ = 2,55% „ = 38,9%	
0,1000 „ l-Leuc.-glutam.	„ 2,55 „ = 2,55% „ = 38,8%	
0,1002 „ Glutamin	„ 6,30 „ = 6,29% „ = 57,7%	

¹⁾ Die maximale Menge NH₃, welche das von uns benutzte Glutamin lieferte, betrug 10,90% (siehe oben S. 80, Fußnote 3).

EINHUNDERTUNDFÜNFTER BAND DRITTES UND VIERTES HEFT.

Inhalt.

Seite

von Euler, Hans und Ragnar Blix. Über die Verstärkung der Katalasewirkung in Hefezellen. Mit 2 Figuren im Text . . .	83
Ewald, August. Über die Beiträge zur Kenntnis des Collagens .	115
Ewald, August. Über die Beiträge zur Kenntnis des Collagens II .	135
Schumm, O. Über weitere Untersuchungen bei Haematoporphyria congenita. (II. Mitteilung)	158
Pringsheim, Hans und Adelheid Magnus-von Merkatz. Über die Fermentversuche an Zelluloseabbauprodukten	173

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

S. P. L. Sørensen, H. Pringsheim und H. Magnus, S. Edlbacher, H. Euler und O. Svanberg (2), E. u. H. Salkowski, E. Winterstein, A. E. Weinhausen, E. Vahlen, M. Nelson-Gerhardt.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 18 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, EMIL FISCHER-Berlin, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER, Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, M. SIEGFRIED-Leipzig, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich, R. v. ZEYNER-Prag

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Heidelberg.

Einhundertundfünfter Band:

Drittes und Viertes Heft.

(Ausgegeben am 15. Mai 1919.)

Mit 2 Figuren im Text.

BERLIN und LEIPZIG 1919

VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER
WALTER DE GRUYTER & Co.

vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Velt & Comp.