

Über Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak.

V. Mitteilung.

Von

Peter Bergell und Hanns v. Wülfing.

(Der Redaktion zugegangen am 23. März 1910.)

Durch die Auffindung der tryptischen Spaltung des Leucinamids war für die Synthese die Aufgabe gegeben, aus Ammoniak und Aminosäuren Verbindungen aufzubauen, die außer der Leucinamidbindung auch die für die Eiweißkörper wichtigste Bindung tragen, nämlich die Peptidbindung. Es sind dies die Amide der Peptide. Diese Verbindungen sind bisher nur in Form einzelner Derivate bekannt, wie des Carbäthoxylglycylglycinamids, das zuerst von E. Fischer (Chem. Ber. Bd. XXXV, S. 1095, 1902) durch Einwirkung von Ammoniak auf den Carbäthoxylglycylglycinester gewonnen wurde. Dieselbe Verbindung erhielten später Königs und Mylo (Über einige Amide von Aminosäuren, Chem. Ber. Bd. XLI, S. 4429, 1908), die die Bildung des Glycylglycinamids aus Glycinester und wasserfreiem Ammoniak beobachteten. Da bei dieser Reaktion die Reindarstellung des Glycylglycinamids nicht gelang, wiesen sie die Anwesenheit desselben durch Behandlung mit chlorkohlensaurem Äthyl und somit Überführung in das bekannte Derivat nach. Es hat sich nun auf Grund der früheren Untersuchungen ein einfacher Weg gefunden, einige Amide von Peptiden und zwar nicht nur von gleichnamigen, sondern sogleich von gemischten Peptiden in Form ihrer halogenwasserstoffsäuren Salze zu gewinnen. Die Darstellung des Chloracetylleucinamids gelingt nämlich wesentlich leichter als die des früher von uns beschriebenen Chloracetylglycinamids. Das reine Chloracetyl-

leucinamid ist nun zwar in wässrigem Ammoniak schwer löslich. Bei längerem Stehen bei 35—40° tritt jedoch Lösung ein, wobei der gewünschte Austausch von Cl gegen NH₂ fast quantitativ stattfindet. Auf diesem Wege erhält man das schön krystallisierende Hydrochlorat des Glycylleucinamids.

In analoger Weise gelang es, Leucinamid mit dem Brompropionylrest zu verkuppeln. Bei der Behandlung des entstehenden Brompropionylleucinamids resultierte das gewünschte bromwasserstoffsäure Alanylleucinamid.

Wie es scheint, sind analoge Reaktionen auch für die höheren Polypeptide durchführbar. So wurde die Vorstufe des Amids eines Tripeptids, das Chloracetyl-glycylleucinamid, analysenrein isoliert. Nach einem Vorversuch scheint sich hieraus auch ohne Isolierung des Diglycylleucinamids ein Chloracetyl-diglycylleucinamid, die Vorstufe des Amids eines Tetrapeptids, erhalten zu lassen.

Weitere Versuche ergaben, daß es für die Gewinnung des Chloracetyl-glycylleucinamids nicht notwendig ist, das Amid des Dipeptids zu isolieren. Es gelingt, aus dem Chloracetylleucinamid direkt das Chloracetyl-glycylleucinamid in reiner Form zu erhalten, wodurch natürlich große Verluste vermieden werden. Notwendig ist es allerdings, das durch Ammoniak nicht angegriffene Chloracetylleucinamid durch Aufnehmen mit eiskaltem Wasser abzutrennen. In gleicher Weise läßt sich auch Chloracetylleucinamid aus Bromisocaprinsäureamid darstellen, ohne daß die Zwischenstufe des bromwasserstoffsäuren Leucinamids isoliert werden muß. Es erscheint dies wichtig für den Fall, daß man zu den Amidien höherer Polypeptide vordringen will.

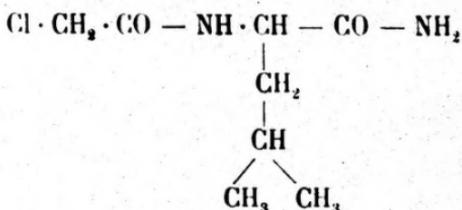
Wir wollen natürlich nicht behaupten, daß die Gewinnung der Amide von Peptiden undurchführbar ist, indem man die Polypeptide in ihre Amide überführt. Vergewenwärtigt man sich jedoch die großen Schwierigkeiten, welche bei der Synthese der Amide der Aminosäuren bei der Behandlung von Aminosäureestern mit Ammoniak in dieser oder jener Form entstehen, so dürfte kein Zweifel über die Brauchbarkeit der angegebenen Auffolger der einzelnen Synthesen herrschen.

Erfolgreich sind dieselben bisher allerdings nur in den Fällen durchgeführt, bei denen das Ammoniak in Form des Säureamids an Leucin gebunden ist, d. h. es sind nur Amide von solchen Polypeptiden gewonnen, bei denen Leucin am Ende der Kette steht.

Über die physiologische Bedeutung dieser Amide von Diptiden haben wir noch kein abschließendes Urteil gewonnen. Wir beobachteten, daß das Glycylleucinamid eine unerwartete Resistenz gegenüber dem Trypsin besitzt, während bekanntlich (Emil Fischer u. Peter Bergell, Chem. Ber. Bd. XXXVI, S. 2603, 1903), die Glycyl-l-Leucinbindung und nach unserer letzten Mitteilung auch l-Leucinamid durch Trypsin verseift wird. Vielleicht ermöglicht es die Fortführung dieser Versuche, die Art der Bindung des Ammoniaks im Eiweiß aufzuklären.

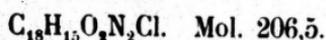
Experimenteller Teil.

Chloracetylleucinamid.



5,2 g bromwasserstoffsäures Leucinamid werden in 10 ccm Wasser gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 25 ccm eiskalter Normalnatronlauge versetzt. 2,7 g Chloracetylchlorid werden unter gutem Schütteln langsam hinzugefügt und in kleinen Portionen noch 1,5 g trockne Soda eingetragen. Es entsteht ein weißer krystalliner Niederschlag, der abgesogen wird. Das Filtrat wird nochmals unter Kühlung mit Normalnatronlauge und Chloracetylchlorid behandelt, wodurch noch eine zweite geringere Krystallfraktion erhalten wird. Erhalten ca. 3 g Substanz, die sofort aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert wird, aus dem sie in großen perlmutterglänzenden Blättern, die sich mit Wasser schwer benetzen, krystallisiert. Im Kapillarröhrchen erhitzt, schmelzen die Krystalle bei 157° (korr.). Sie sind ziemlich schwer löslich in kaltem Wasser, leichter in heißem Wasser und Alkohol, schwer löslich in Äther.

Die Substanz ist krystallwasserfrei und wurde zur Analyse im Vakuumexsikkator getrocknet.



0,1688 g Substanz gaben 0,2880 g CO_2 und 0,1138 g H_2O .

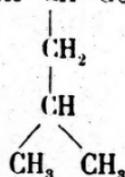
0,1694 „ „ „ 19,1 ccm N (14° , 767 mm).

0,1200 „ „ „ (nach Carius) 0,0822 g AgCl.

Berechnet: C = 46,49%, H = 7,26%, N = 13,56%, Cl = 17,19%.

Gefunden: C = 46,53%, H = 7,48%, N = 13,43%, Cl = 16,94%.

Glycyl-dl-Leucinamid.



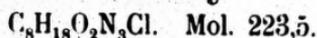
3 g reines Chloracetylleucinamid werden mit 60 ccm 25%igem wässrigem Ammoniak 6 Stunden auf der Maschine geschüttelt, wobei ein Teil in Lösung geht; darauf wird die festverschlossene Flasche 12 Stunden bei 40° aufbewahrt. Nach dieser Zeit ist der Niederschlag völlig gelöst. Er wird im Vakuum unter 40° eingedampft und der Rückstand aus 15 ccm absolutem Alkohol umkrystallisiert. Es scheiden sich Krystalle aus, die unter dem Mikroskop als flache Blättchen erscheinen. Im Kapillarröhrchen erhitzt, schmelzen sie bei $211-212^\circ$ (korr.) zu einem hellen Öl, das nach kurzer Zeit rotbraun gefärbt erscheint. Ausbeute 2 g. Die Substanz ist spielend löslich in Wasser und leichtlöslich in heißem Alkohol, schwerer im kalten Alkohol. Die wässrige Lösung schmeckt bitter und reagiert schwach sauer. Die Verbindung ist krystallwasserfrei und wurde zur Analyse im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

0,1675 g Substanz gaben 0,2594 g CO_2 und 0,1224 g H_2O .

0,1548 „ „ „ 24,1 ccm N (16° , 759 mm).

0,1848 „ „ „ 0,1160 g AgCl bei der direkten Fällung

mit Silbernitrat in salpetersaurer Lösung.



Berechnet: C = 42,95%, H = 8,05%, N = 18,79%, Cl = 15,88%.

Gefunden: C = 42,23%, H = 8,12%, N = 18,19%, Cl = 15,33%.

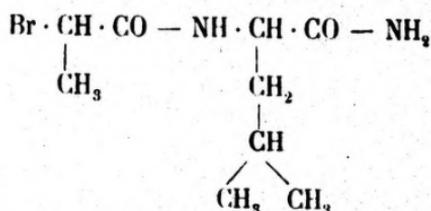
Ein Präparat einer zweiten Darstellung hatte gleiche

Eigenschaften und gab nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol folgende Zahlen:

0,1489 g Substanz gaben 0,2340 g CO₂ = 42,86% C.

0,1489 „ „ „ 0,1092 „ H₂O = 8,15% H.

Brompropionylleucinamid.



5,2 g bromwasserstoffsäures Leucinamid werden in 25 ccm kalter Normalnatronlauge gelöst und mit 3 g Brompropionylbromid unter guter Kühlung geschüttelt. Es scheidet sich ein weißer Niederschlag ab, der zunächst halbfest, aber beim Reiben mit dem Glasstab krystallisiert wird. Er wird sofort aus heißem 95%igem Alkohol umkrystallisiert. Unter dem Mikroskop erscheint die neue Verbindung als feine, zu Rosetten und Sternen gruppierte Nadeln. Die Ausbeute beträgt 3 g. Im Kapillarröhrchen erhitzt, schmilzt die Substanz bei 150–151° (korr.). Sie ist krystallwasserfrei und wird zur Analyse im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Die Verbindung ist in kaltem Wasser schwer löslich, leichter in heißem Wasser, aus dem sie sich ohne Zersetzung umkrystallisiert. Ziemlich schwer löslich ist sie in kaltem Alkohol, schwer löslich in Äther.

(C₉H₁₇O₂N₂Br. Molekulargewicht 265).

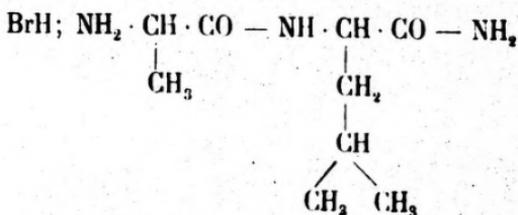
0,1193 g Substanz gaben 0,1796 g CO₂ und 0,0713 g H₂O.

0,1542 „ „ „ 14,0 ccm N (15°, 743 mm).

Berechnet: C = 40,75%, H = 6,41%, N = 10,56%.

Gefunden: C = 41,05%, H = 6,64%, N = 10,43%.

Alanylleucinamid.



Die Behandlung des Brompropionylleucinamids mit wässe-

rigem Ammoniak wird in ähnlicher Weise durchgeführt, wie beim Chloracetylleucinamid beschrieben wurde. 2,7 g Substanz wurden mit 30 ccm wässrigem Ammoniak 16 Stunden im Brutschrank aufbewahrt, wobei alles in Lösung geht. Es wird im Vakuum unter 40° eingedampft, der Rückstand in wenig heißem Alkohol gelöst. Der sich ausscheidende Niederschlag wird sofort nochmals aus 8 ccm absolutem Alkohol umkrystallisiert. Die neue Verbindung krystallisiert in feinen Nadeln, die ein Molekül Krystallwasser enthalten. Im Kapillarröhrchen erhitzt, schmilzt sie zunächst gegen 80° in ihrem Krystallwasser, um bei weiterem Erhitzen über 110° teilweise wieder fest zu werden, worauf bei 140° völliges Schmelzen erfolgt.

In ihren Eigenschaften und Reaktionen unterscheidet sich diese Verbindung von dem oben beschriebenen Hydrochlorat des Glylylleucinamids nur durch eine etwas größere Löslichkeit in Alkohol.

Zur Analyse diente die krystallwasserhaltige Substanz, die im nicht evakuierten Exsikkator getrocknet war.

$C_9H_{22}O_3N_3Br$. (Molekulargewicht 300.)

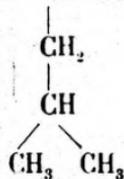
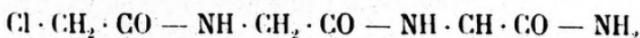
0,2075 g Substanz gaben 0,2754 g CO_2 und 0,1429 g H_2O .

0,1232 „ „ 14,7 ccm N (15° , 761 mm).

Berechnet: C = 36,00%, H = 7,33%, N = 14,00%.

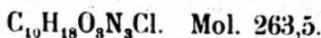
Gefunden: C = 36,19%, H = 7,65%, N = 14,05%.

Chloracetylglycylleucinamid.



2,1 g salzsaures Glycylleucinamid werden in wenig Wasser gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 11 ccm kalter Normalnatronlauge versetzt. Es wird zunächst 1 g Chloracetylchlorid hinzugefügt und unter gutem Kühlen geschüttelt. Die Flüssigkeit bleibt zunächst klar. Beim Reiben mit dem Glasstab und weiterem Kühlen tritt Krystallisation ein. Die Krystalle werden abgesaugt und das Filtrat nochmals mit Natronlauge und 1,5 g Chloracetylchlorid behandelt, wobei eine zweite Krystallfraktion

erhalten wird. Beide Krystallfraktionen werden vereinigt und aus sehr verdünntem Spirit umkrystallisiert. Ausbeute: 2 g. Die Chloracetylierung des Peptids verläuft demnach glatter als beim Leucinamid. Die Krystalle erscheinen unter dem Mikroskop als kleine weiße Nadelchen und schmelzen im Kapillarröhrchen erhitzt bei 189—190° (korr.). Schwer löslich in kaltem Wasser, leicht in Alkohol, schwerer in Äther.



0,1510 g Substanz gaben 20,0 ccm N (15°, 743 mm).

N berechnet = 15,93%, gefunden = 15,21%.

Nach nochmaligem Umkrystallisieren schmolz die Substanz bei 190—191° (korr.). Zur Analyse wurde sie im Vakuum-exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

0,1556 g Substanz gaben 0,2588 g CO₂.

0,1556 g Substanz gaben 0,0968 g H₂O.

Berechnet: C = 45,53%, H = 6,83%.

Gefunden: C = 45,36%, H = 6,94%.

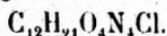
Die gleiche Verbindung wurde aus dem Chloracetylleucinamid direkt gewonnen. Dasselbe wurde mit wässrigem Ammoniak wie oben beschrieben behandelt, darauf die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand in wenig eiskaltem Wasser aufgenommen, wobei etwas Chloracetylleucinamid ungelöst bleibt. Es wird abgesaugt und das Filtrat sofort mit Chloracetylchlorid behandelt und der Niederschlag aus Alkohol umkrystallisiert.

Ebenso wurde Chloracetylleucinamid direkt aus Bromisocaprönsäureamid gewonnen. 16 g rohes, nicht umkrystallisiertes Bromisocaprönsäureamid werden mit alkoholischem Ammoniak 4 Stunden im Rohr auf 105—110° erhitzt. Darauf wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, filtriert und sofort mit Alkali und Chloracetylchlorid behandelt. Erhalten an reinem Chloracetylleucinamid vom Schmelzpunkt 157° 6,6 g.

Die Krystallisationskraft der Chloracetylkörper erscheint also so groß, daß eine völlige Reinheit des Ausgangsmaterials nicht nötig ist. Da sich zudem die neuen Verbindungen bei saurer wie alkalischer Reaktion relativ leicht abscheiden, können

sie auch für den Nachweis der Amide von Aminosäuren und Peptiden wichtig sein. 1 g Chloracetylglycylleucinamid wurde mit 15 ccm wässrigem 25^o/_oigem Ammoniak bei 40^o 24 Stunden hindurch aufbewahrt, wobei alles in Lösung geht. Es wird im Vakuum eingedampft, mit kaltem Wasser aufgenommen, von wenig ungelösten Krystallen abgesaugt und das Filtrat in gewohnter Weise mit Chloracetylchlorid und Natronlauge behandelt. Die Flüssigkeit blieb zunächst klar, beim längeren Stehen schieden sich eine reichliche Menge von Krystallen ab. Dieselben wurden abgesaugt und aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 193—194^o (korr.). Die Stickstoffanalyse weist darauf hin, daß Chloracetyldiglycylleucinamid entstanden war.

0,1310 g Substanz gaben 18,8 ccm N (16^o, 758 mm).



N berechnet = 17,47^o/_o, gefunden = 16,80^o/_o.