

Angewandt		Verbraucht in ccm $\frac{1}{20}$ -n.	Berechnet mg MoO <sub>3</sub>	Differenz mg MoO <sub>3</sub>
in ccm MoO <sub>3</sub> = in mg MoO <sub>3</sub>				
10	0.1818	15.71	0.1813	— 0.5
10	0.1818	15.73	0.1815	— 0.3
20	0.3636	31.52	0.3639	+ 0.3
20	0.3636	31.46	0.3632	— 0.4
15	0.2727	23.56	0.2720	— 0.7

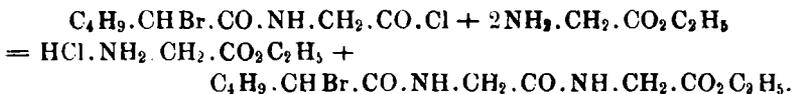
Odessa, den 4/17. Januar 1905. Laboratorium der »Société anonyme de Produits chimiques et Huilerie«.

### 98. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate.

[Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 21. Januar 1905.)

Am Schlusse der vierten Mittheilung<sup>1)</sup> ist kurz eine neue Methode für den Aufbau von Polypeptiden erwähnt, welche es gestattet, die Kette der Aminosäuren auf der Seite des Carboxyls zu verlängern. Ist nämlich die Aminogruppe durch Einführung eines halogenhaltigen Säureradicals geschützt, so lässt sich durch Chlorphosphor das Carboxyl in die Säurechloridgruppe verwandeln, und das Chlorid kann dann mit Aminosäureestern combinirt werden. Die Reaction wurde aufgefunden bei dem  $\alpha$ -Bromisocapronylglycin, dessen Chlorid mit Glykocollester nach folgender Gleichung zusammentritt:



Dieser Ester kann dann durch Verseifung und nachfolgende Behandlung mit Ammoniak in Leucylglycylglycin verwandelt werden.

Ich habe das Verfahren jetzt an neuen Beispielen geprüft. Dabei hat sich herausgestellt, dass die experimentelle Ausführung der Reaction allerdings eine subtile Arbeit ist, dass diese aber trotzdem gewiss in manchen Fällen mit Vortheil für die Synthese von Polypeptiden benutzt werden kann.

Die Bildung des Säurechlorids ist auch bei complicirteren Systemen noch möglich, wie das Verhalten des  $\alpha$ -Bromisocapronylglycylglycins zeigt, und die Combination seines Chlorids mit Glycin-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 37, 3070 [1904].

ester führt weiter zum  $\alpha$ -Bromisocapronyldiglycylglycinester, aus dem durch Verseifung und Behandlung mit Ammoniak das entsprechende Tetrapeptid entsteht. Dass man ferner bei dem Verfahren an Stelle des einfachen Glycinesters auch Polypeptidester verwenden kann, lehrt die Combination von  $\alpha$ -Bromisocapronylglycinchlorid mit Glycylglycinester, wobei der gleiche  $\alpha$ -Bromisocapronyldiglycylglycinester resultirt.

Nach diesen Erfahrungen lag es nahe, dieselbe Reaction auf andere Acylderivate der Aminosäuren, z. B. die Benzoylkörper, zu übertragen. Die Wechselwirkung zwischen Hippursäure und Phosphor-pentachlorid ist wiederholt Gegenstand der Untersuchung gewesen, ohne dass es gelungen wäre, das gesuchte Hippurylchlorid,  $C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot Cl$ , zu gewinnen. Ich war deshalb überrascht, dass die Darstellung dieses Körpers durch Schütteln von fein gepulverter Hippursäure mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid ausserordentlich leicht ausgeführt werden kann. Das Product selbst ist ein schön krystallisirter Körper, dessen Verwandlung in Ester, Amid und ähnliche Derivate sich mit grösster Leichtigkeit vollzieht. Fast ebenso gut lässt sich das Chlorid mit den Estern der Aminosäuren oder mit der alkalischen Lösung der Letzteren in Reaction bringen, wie ich an seiner Verwandlung in Benzoylglycylglycin zeigen werde. Dieses kann wiederum durch Phosphorpentachlorid in das Chlorid und durch nachträgliche Behandlung mit Glycinester in Benzoyldiglycylglycinester übergeführt werden. So lassen sich mithin dieselben Benzoylkörper gewinnen, die Th. Curtius und seine Schüler mit Hülfe der Azide dargestellt haben<sup>1)</sup>.

Durch solche Erfolge ermuthigt, habe ich endlich nochmals das Verhalten der freien Aminosäuren gegen Chlorphosphor geprüft und gefunden, dass hier beim Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphor-pentachlorid krystallinische Producte entstehen, die als Hydrochlorate der Aminosäurechloride von der allgemeinen Formel

$$\begin{array}{c} R \cdot CH \cdot CO \cdot Cl \\ | \\ NH_3 \cdot Cl \end{array}$$

betrachtet werden können.

Analysirt wurden bisher die Derivate des racemischen Alanins, Leucins und der  $\alpha$ -Aminobuttersäure. Für Glykocoll, das ein etwas abweichendes Verhalten zeigt, sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Genauer studirt sind die Umsetzungen beim salzsauren Leucylchlorid. Es löst sich in Wasser unter Bildung von salzsaurem Leucin, und mit Alkohol erzeugt es Leucinester. Ferner liefert es, mit Glycinester combinirt, reichliche Mengen von Leucylglycinester bezw. Leucylglycinanhydrid.

<sup>1)</sup> Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 57 [1904]

Wenn diese Reaction sich verallgemeinern lässt, so ist sie eine überaus werthvolle Erweiterung der Polypeptidsynthese; denn es wird dadurch möglich, die optisch-activen Spaltproducte der Proteinstoffe direct in mannigfaltigster Weise zu verkuppeln.

Der Aufbau der Polypeptide ist mit Hinblick auf die natürlichen Proteine ein so vielgestaltiges Problem, dass es ohne Zweifel noch einer ganzen Reihe von Methoden bedarf, um alle wünschenswerthen Möglichkeiten zu verwirklichen. Aus diesem Grunde wird auch noch ein anderes neues Verfahren von Werth sein, Dipeptide bequem darzustellen, das darin besteht, die Diacipiperazine durch Alkali aufzuspalten. Früher habe ich die Verwandlung durch Kochen mit Säuren ausgeführt; bequemer gelingt sie, wenigstens bei den einfachen Gliedern der Klasse, durch kaltes, verdünntes Alkali. Wird z. B. fein gepulvertes Glycinanhydrid mit der äquimolekularen Menge Normalnatronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, so geht es bald in Lösung und verwandelt sich dabei in das Alkalisalz des Glycylglycins. Wird dann die Lösung mit Säurechloriden, wie Benzoylchlorid oder Bromisocapronylchlorid, geschüttelt, so entstehen in sehr befriedigender Ausbeute die entsprechenden Acylderivate, das Benzoylglycylglycin und das Bromisocapronylglycylglycin, deren praktische Darstellung dadurch viel bequemer wird.

Diese überraschend leichte Aufspaltung des Diacipiperazins durch verdünntes, kaltes Alkali giebt auch einen neuen Gesichtspunkt für das Studium der Proteinstoffe. Denn ihre vollständige Hydrolyse durch Fermente in schwach alkalischer Lösung bis zu den einfachen Aminosäuren kann jetzt nicht mehr als Grund gegen die Annahme von Diacipiperazinsringen im Molekül angesehen werden.

Da diese Ringe bei den künstlichen Polypeptiden so leicht entstehen, so halte ich es vielmehr für wahrscheinlich, dass sie auch in manchen natürlichen Proteinstoffen vorhanden sind. Möglicherweise spielen sie bei der Denaturirung der genuinen Eiweisskörper und bei der Bildung der Alkalialbuminate eine Rolle. Ich bemerke aber ausdrücklich, dass bisher der stichhaltige Beweis für die Anwesenheit dieser Gruppe fehlt; denn die wiederholt behauptete Bildung von Leucinimid bei der Spaltung von Eiweisskörpern durch Säuren oder Fermente ist nach Beobachtungen im hiesigen Institut recht zweifelhaft.

#### Aufspaltung des Glycinanhydrids durch Alkali.

Wird 1 g gepulvertes Glycinanhydrid mit 10 ccm Normal-Natronlauge (berechnet für 1 Mol. 8.8 ccm) bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, so geht es rasch in Lösung, und nach 15–20 Minuten ist die Verwandlung in Glycylglycin vollzogen. Neutralisirt man jetzt mit 10 ccm.

Normal-Salzsäure und verdampft die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck auf einige Cubiccentimeter, so scheidet sich das Glycylglycin als farblose Krystallmasse ab. Isolirt wurden von dem reinen Präparat 0.6 g; seine Menge ist aber jedenfalls viel grösser, wie die späteren Beobachtungen zeigen; nur ist es nicht möglich, es aus der kochsalzhaltigen Mutterlauge völlig zu isoliren. Für die praktische Darstellung des Glycylglycins ist das Verfahren ungefähr gleichwerthig mit der früher beschriebenen Aufspaltung durch Salzsäure. Ausserordentlich viel bequemer wird aber die Methode, wenn es sich um die Gewinnung von Acylderivaten des Dipeptids handelt.

#### Neue Darstellung von $\alpha$ -Bromisocapronyl-glycylglycin<sup>1)</sup>.

15 g fein gepulvertes Glycinanhydrid werden mit 150 ccm Normal-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur bis zur völligen Lösung geschüttelt, was nach 10—15 Minuten der Fall ist. Dann lässt man die Flüssigkeit noch etwa 15 Minuten stehen, kühlt auf ungefähr 0° ab und trägt nun im Laufe einer halben Stunde unter kräftigem Schütteln in kleinen Portionen abwechselnd 33 g  $\alpha$ -Bromisocapronylchlorid (1 $\frac{1}{8}$  Mol.) und 225 ccm Normal-Natronlauge ein, sodass die Flüssigkeit stets alkalisch ist; zum Schluss wird die klare Lösung mit Salzsäure übersättigt, das ausgeschiedene Bromisocapronyl-glycylglycin abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, dann im Vacuumexsiccator getrocknet und zur Entfernung kleiner Mengen Bromisocapronsäure mit Petroläther ausgelangt. Die Ausbeute betrug 36.2 g oder 89 pCt. der Theorie, berechnet auf das angewandte Glycinanhydrid. Zur völligen Reinigung genügt einmaliges Umkrystallisiren aus Wasser unter Zusatz von Thierkohle, wobei allerdings ungefähr  $\frac{1}{4}$  in der Mutterlauge bleibt.

#### Neue Darstellung des Benzoyl-glycylglycins<sup>2)</sup>.

5 g Glycinanhydrid wurden, wie zuvor, mit 50 ccm Normal-Natronlauge aufgespalten, dann stark abgekühlt und dazu im Laufe einer halben Stunde unter Schütteln abwechselnd 7.5 g Benzoylchlorid (ca. 1 $\frac{1}{4}$  Mol.) und 65 ccm Normal-Natronlauge zugegeben. Die schliesslich filtrirte alkalische Flüssigkeit gab beim Uebersättigen mit Salzsäure einen krystallinischen Niederschlag, der nach einstündigem Stehen bei 0° abgesaugt und zuerst mit kaltem Wasser, dann zur Entfernung der Benzoësäure mit Aether gewaschen wurde. Zur Reinigung wurde das Product aus der 15-fachen Menge kochendem Wasser umkrystallisirt. Die Ausbeute an Rohproduct betrug 10 g und an reinem Präparat 8 g oder 77 pCt. der Theorie, berechnet auf das Glycinanhydrid. Das Präparat schmolz bei 208° (corr.), während Curtius 206.5° angiebt.

0.1676 g Sbst.: 17.3 ccm N (17°, 749 mm).

$C_{11}H_{12}O_4N_2$ . Ber. N 11.90. Gef. N 11.83.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 2989 [1903].

<sup>2)</sup> Curtius, Journ. für prakt. Chem. [2] 26, 175 und [2] 70, 76.

Da das Glycinanhydrid leicht zu bereiten ist, so halte ich diese Darstellungsweise für bequemer als die von Curtius angegebene. Noch besser aber dürfte die später beschriebene Gewinnung aus Hippurylchlorid und Glykocoll sein.

Aehnlich dem Glycinanhydrid wird das Alaninanhydrid von verdünntem Alkali aufgespalten. Schüttelt man 1 g fein gepulvertes Anhydrid mit einem Gemisch von 8 ccm Normal-Natronlauge und 12 ccm Wasser bei Zimmertemperatur, so tritt bald klare Lösung ein, und nach mehrstündigem Stehen ist die Verwandlung in das Dipeptid vollzogen. Das hierbei entstehende Alanylalanin ist bisher nur in Form seines Carbäthoxylester-Derivats<sup>1)</sup> isolirt worden. Ebenso leicht wie dieses lassen sich aber auch seine Combinationen mit halogenhaltigen Säureresten darstellen. So hat Hr. Dr. Kautzsch im hiesigen Institut aus der alkalischen Lösung durch Einwirkung von Brompropionylbromid und  $\alpha$ -Bromisocapronylchlorid krystallinische Producte von der erwarteten Zusammensetzung in reichlicher Ausbeute gewonnen. Von dem  $\alpha$ -Bromisocapronylalanylalanin konnten sogar zwei Isomere isolirt werden, und es unterliegt keinem Zweifel, dass man auf diesem Wege noch zahlreiche Polypeptide des Alanylalanins erhalten kann. Wählt man für die Aufspaltung des Alaninanhydrids die Natronlauge concentrirter als zuvor angegeben, schüttelt man z. B. das Anhydrid mit der oben angegebene Menge Lauge ohne Wasserzusatz, so findet zwar auch vorübergehend Lösung statt, aber fast unmittelbar hinterher scheidet sich ein krystallinisches Natriumsalz ab, das aus wenig warmem Wasser oder Alkohol in äusserst feinen Nadelchen krystallisirt. Ganz ähnlich ist die entsprechende Kaliumverbindung. Ob diese Körper Salze des Alaninanhydrids oder des Alanylalanins sind, bleibt noch zu entscheiden.

Viel beständiger ist das Leucinimid gegen Alkalien. Von kalten wässrigen Laugen wird es auch beim stundenlangen Schütteln kaum angegriffen, woran allerdings auch seine sehr geringe Löslichkeit in kaltem Wasser schuld sein kann. Aber selbst in warmer, alkoholischer Lösung erfolgt der Angriff der Alkalien sehr langsam, sodass die Methode hier keinen Werth hat.

Die Aufspaltung des Diacipiperazinringes wird also in auffallender Weise durch die Natur der damit verbundenen Alkylé beeinflusst, und es scheint hier ein neuer Fall von sog. sterischer Hinderung vorzuliegen, der eine ausführlichere Untersuchung verdient.

<sup>1)</sup> E. Fischer, diese Berichte 35, 1103 [1902].

$\alpha$ -Bromisocapronyl-diglycylglycinester,  
 $C_4H_9 \cdot CHBr \cdot CO \cdot NHCH_2CO \cdot NHCH_2CO \cdot NHCH_2CO_2C_2H_5$ .

Zur Gewinnung dieser Verbindung aus dem  $\alpha$ -Bromisocapronylglycylglycin werden 2 g fein gepulvert, gesiebt, mit 30 ccm frisch destillirtem Acetylchlorid übergossen und nach dem Abkühlen in Eiswasser in 3 Portionen 2 g frisches und rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid unter tüchtigem Schütteln und häufigem Abkühlen zugegeben. Die Operation dauert 15–20 Minuten. Phosphorpentachlorid und Bromisocapronylglycylglycin lösen sich dabei bis auf eine geringe Menge von kleinen, glitzernden Kryställchen, und die Flüssigkeit nimmt eine schwach gelbe Farbe an. Sie wird, ohne zuvor filtrirt zu sein, unter einem Druck von 0.5 mm und unter gleichzeitiger Kühlung mit Eiswasser rasch verdunstet. Dabei scheidet sich eine feste, zum Theil krystallinische Masse ab. Um die letzten Reste von Acetylchlorid und Phosphoroxychlorid zu entfernen, wird sie mit Petroläther ausgelaugt, die Flüssigkeit abgegossen, der Rückstand (2 g) rasch und bei möglichstem Ausschluss von Feuchtigkeit abfiltrirt und sofort in eine verdünnte, ätherische Lösung (4-proc.) von überschüssigem Glykocoll-ester eingetragen. Nach 1½-stündigem Schütteln auf der Maschine ist die Umsetzung beendet, und die ungelöste Masse ein Gemisch von  $\alpha$ -Bromisocapronyldiglycylglycinester und salzsaurem Glykocoll-ester. Letzterer wird nach dem Absaugen und Waschen mit Aether durch Auslaugen mit wenig kaltem Wasser entfernt. Die Ausbeute an Bromisocapronyldiglycylglycinester betrug gewöhnlich 0.75 g oder 29 pCt. der Theorie. Zur völligen Reinigung wurde der Ester aus ungefähr der 65-fachen Menge kochenden Wassers unter Zusatz von etwas Thierkohle umkrystallisirt und zur Analyse im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

0.1948 g Sbst.: 17.4 ccm N (17°, 778.5 mm). — 0.1118 g Sbst.: 0.0536 g AgBr.

$C_{14}H_{24}O_5N_3Br$ . Ber. N 10.68, Br 20.28.  
 Gef. » 10.69, » 20.40.

Die Substanz schmilzt bei 181° (corr. 184.5°) unter schwacher Gelbfärbung. Sie krystallisirt aus heissem Wasser in feinen, knollenartigen Aggregaten und aus heissem Alkohol, worin sie viel leichter löslich ist, in feinen, büschel- oder sternförmig angeordneten Nadeln.

Viel bequemer als das zuvor beschriebene Verfahren ist die Darstellung des Esters aus Bromisocapronylglycin und Glycylglycinester.

5 g gepulvertes  $\alpha$ -Bromisocapronylglycin werden mit 30 ccm frischem Acetylchlorid übergossen und nach Zusatz von 5 g zerkleinertem Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur 10–15 Minuten geschüttelt, bis klare Lösung erfolgt ist, und dann die Flüssigkeit unter 0.5 mm Druck und gleichzeitiger Kühlung mit Eiswasser rasch verdampft. Den hierbei bleibenden, ganz schwach gefärbten Syrup schüttelt man zuerst kräftig mit Petroläther, um den Rest des Phosphoroxychlorids möglichst zu entfernen, giesst den Petroläther ab, wiederholt diese Operation und löst schliesslich den Rückstand in trockenem Aether. Die ätherische Lösung wird ziemlich rasch

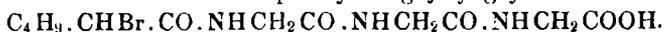
eingetroppt in eine mit Eis gekühlte und bewegte Chloroformlösung von Glycylglycinester (ca. 75 ccm), die aus 12 g Hydrochlorat in der früher beschriebenen Weise<sup>1)</sup> gewonnen ist. Die Mischung trübt sich anfangs nur, zum Schluss der Operation beginnt die Abscheidung von Krystallen. Man lässt 12 Stunden stehen, wobei eine reichliche Abscheidung eines fast farblosen, krystallinischen Niederschlages erfolgt. Er wird filtrirt und mit Aether gewaschen. Seine Menge betrug 11 g, und nach dem Auslaugen mit kaltem Wasser, wodurch der beigemengte Glycylglycinester gelöst wird, fast 8 g. Diese gaben beim Umkrystallisiren aus 400 ccm heissem Wasser 5.4 g, und aus der Mutterlauge wurden noch 1.1 g gewonnen. Die Gesamtausbeute an fast reinem Product war deshalb mehr als 80 pCt. der Theorie. Schmp. 181° (uncorr.).

0.1937 g Sbst.: 0.3053 g CO<sub>2</sub>, 0.1095 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Br. Ber. C 42.61, H 6.13.

Gef. • 42.90, » 6.32.

#### α-Bromisocapronyl-diglycylglycin.



5 g Ester werden gepulvert und mit einem Gemisch von 14 ccm Normalnatronlauge und 20 ccm Wasser 3 Stunden auf der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur bis zur Lösung geschüttelt. Wird dann die Flüssigkeit mit 3 ccm 5-fach Normal-Salzsäure versetzt, so beginnt nach einiger Zeit die Abscheidung des Bromisocapronyldiglycylglycins. Man lässt 12 Stunden bei 0° stehen und saugt ab. Die Ausbeute beträgt ungefähr 75 pCt. des angewandten Esters. Zur Analyse wurde aus warmem Alkohol, worin die Verbindung ziemlich leicht löslich ist, umkrystallisirt und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

0.1841 g Sbst.: 0.2678 g CO<sub>2</sub>, 0.0920 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Br. Ber. C 39.32, H 5.50.

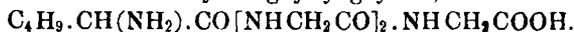
Gef. » 39.60, » 5.59.

Die Substanz schmilzt bei 165° (corr. 168°) und färbt sich dabei schwach braun.

In heissem Wasser ist sie leicht löslich und scheidet sich beim Erkalten ziemlich langsam als sehr feine, krystallinische Masse ab.

Aus Alkohol krystallisirt sie in sehr feinen Nadelchen, die meist zu kugelförmigen Aggregaten vereinigt sind. Ebenso krystallisirt sie aus warmem Aceton, worin sie ziemlich schwer löslich ist. Von Aether, Chloroform wird sie recht schwer aufgenommen.

#### Leucyl-diglycylglycin,



Löst man 1 g der vorhergehenden Säure in 5 ccm Ammoniak von 25 pCt. und lässt bei Zimmertemperatur einige Tage stehen, so

<sup>1)</sup> Diese Berichte 34, 2872 [1901].

ist alles Halogen abgespalten und in der Flüssigkeit ein Niederschlag von äusserst feinen, mikroskopischen Nadelchen entstanden. Da die Flüssigkeit sich beim Eindampfen auf dem Wasserbade gelb färbt und bei der Vacuumdestillation sehr schäumt, so lässt man sie am besten im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure verdunsten. Die zurückbleibende gummiartige Masse löst sich in wenig Alkohol bei gelindem Erwärmen auf. Fügt man aber mehr absoluten Alkohol zu und erwärmt stärker, so beginnt bald die Krystallisation des Tetrapeptids in äusserst feinen, meist kugelförmig vereinigten Nadelchen. Man lässt bei gewöhnlicher Temperatur 1—2 Stunden stehen und saugt ab. Zur Reinigung löst man in sehr wenig Wasser und wiederholt die Abscheidung mit Alkohol in der gleichen Art, bis das Product ganz frei von Bromwasserstoff ist. Die Ausbeute an reinem Tetrapeptid betrug ca. 55 pCt. der Theorie. Für die Analyse war über Schwefelsäure getrocknet.

0.1524 g Subst.: 0.2647 g  $\text{CO}_2$ , 0.1007 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_4$ . Ber. C 47.63, H 7.32.

Gef. » 47.37, » 7.39.

Beim raschen Erhitzen fängt die Verbindung bei  $215^\circ$  an, sich dunkel zu färben; erhitzt man schnell weiter, so schmilzt sie gegen  $228^\circ$  (corr.  $233^\circ$ ) zu einer tiefdunklen Flüssigkeit. In Wasser ist sie sehr leicht, in Alkohol aber sehr schwer löslich. Mit Alkali und wenig Kupfervitriol zeigt sie schöne Biuretfärbung.

#### Hippurylchlorid, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO.NH.CH}_2\text{COCl}$ .

Die Verwandlung der Hippursäure in ihr Chlorid vollzieht sich beim Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur recht glatt. Da aber sowohl das Ausgangsmaterial wie das Endproduct recht schwer löslich sind, so ist es für die völlige Umwandlung erforderlich, ersteres sehr fein zu pulvern und am besten durch ein Haarsieb zu treiben.

Schüttelt man 1 Theil so vorbereitete trockne Hippursäure mit 10 Theilen frischem Acetylchlorid und 1.3 Theilen grob gepulvertem Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur, so geht ein kleiner Theil in Lösung, aber bald nachher scheidet sich das Hippurylchlorid als dicker Brei ab, der sich bei weiterem Schütteln in ein schönes schweres Krystallpulver verwandelt. Zur Umwandlung aller Hippursäure ist natürlich längeres Schütteln nöthig; bei grösseren Mengen wurde deshalb im wohlverschlossenem Gefäss 1 Stunde auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit ist der allergrösste Theil des Hippurylchlorids als farblose Krystallmasse abgeschieden, die unter möglichstem Ausschluss von Feuchtigkeit abgesaugt, mit Petroläther

gewaschen und im Vacuum über Phosphorsäureanhydrid vom Lösungsmittel befreit wird. Die Ausbeute beträgt etwa 80 pCt. der Hippursäure. Aus der Acetylchlorid-Mutterlauge lässt sich durch starkes Abkühlen oder auch durch rasches Verdampfen unter sehr geringem Druck eine zweite, aber viel kleinere Krystallisation erzielen. Bleibt die Mutterlauge längere Zeit stehen, oder wird sie erhitzt, so nimmt sie eine immer stärker werdende gelbe Farbe an.

0.5274 g Stbst.: 0.3802 g AgCl. — 0.1886 g Stbst.: 12.2 ccm N (22°, 746 mm).

$C_7H_5O_2NCl$ . Ber. Cl 17.95, N 7.12.

Gef. " 17.82, " 7.22.

Aus warmem Acetylchlorid lässt sich das Chlorid umkrystallisiren. nur darf das Erhitzen nicht lange dauern, da sonst Gelbfärbung eintritt. Es krystallisirt daraus in feinen farblosen Nadeln. Aus Benzol und Toluol lässt es sich ebenfalls unlösen. In Petroläther ist es so gut wie unlöslich. In luftdicht schliessenden Gefässen zeigt es auch bei wochenlangem Aufbewahren im Licht keine Veränderung. Im Capillarrohr erhitzt, fängt es gegen 125° an, sich gelb zu färben, wird dann dunkelroth und schmilzt bei etwas höherer Temperatur, natürlich nicht constant. Gegen Wasser ist es sehr empfindlich; in Folge dessen riecht das in feuchter Luft aufbewahrte Präparat stark nach Salzsäure. In Wasser löst es sich sofort und bildet Hippursäure. Ebenso leicht wird es von Alkohol in Hippursäureester verwandelt. Wie glatt der Process sich vollzieht, zeigt folgender Versuch:

4 g möglichst frisches Chlorid wurden in 15 ccm absolutem Alkohol eingetragen, wobei ziemlich starke Erwärmung stattfand. Beim Verdünnen mit Wasser fiel der Hippursäureester als Oel aus, das ausgeäthert wurde. Nach dem Trocknen mit Kaliumcarbonat wurde der ätherische Auszug verdampft, der Rückstand wieder in wenig Aether gelöst und der Hippursäureester durch Zusatz von Petroläther zur Krystallisation gebracht. Die schönen, farblosen Nadeln schmolzen bei 67.5°, und die Ausbeute betrug 4 g oder 95 pCt. der Theorie.

#### Verwandlung des Hippurylchlorids in Hippuramid.

Trägt man das Chlorid in eine gesättigte und mit Eis gekühlte, ätherische Lösung von Ammoniak unter kräftigem Schütteln ein und ersetzt das verbrauchte Ammoniak durch Einleiten von neuem trockenem Gas, so erfolgt keine Lösung, da an die Stelle des Chlorids ein Gemisch von Chlorammonium und Hippuramid tritt. Letzteres lässt sich durch Krystallisation des Rohproductes aus heissem Wasser unter Zusatz von etwas Thierkohle reinigen. Die Ausbeute war befriedigend. Das Präparat zeigte den Schmp. 183°.

0.1823 g Stbst.: 0.4027 g CO<sub>2</sub>. 0.0920 g H<sub>2</sub>O. — 0.1592 g Stbst.: 21.2 ccm N (14°, 768.5 mm).

$C_9H_{10}O_2N_2$ . Ber. C 60.62, H 5.66, N 15.70.  
Gef. » 60.25, » 5.64, » 15.87.

### Verwandlung des Hippurylchlorids in Benzoyl-glycylglycin.

Die Kuppelung kann sowohl mit Glykocolester in ätherischer Lösung, wie mit Glykocoll in alkalischer Lösung ausgeführt werden.

Im ersten Falle wird das Hippurylchlorid in eine abgekühlte und stark verdünnte, ätherische Lösung von überschüssigem Glykocolester (mehr als 2 Mol.) eingetragen und das Gemisch  $\frac{1}{2}$  Std. kräftig geschüttelt. Die ausgeschiedene Krystallmasse ist ein Gemisch von salzsaurem Glykocolester und Benzoylglycylglycinester. Sie wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniak ausgelaut und der übrig gebliebene Theil aus der ungefähr 20-fachen Menge Wasser unter Zusatz von etwas Thierkohle umkrystallisirt. Im Vacuum getrocknet, zeigte das Product den von Curtius<sup>1)</sup> für den Benzoylglycylglycinester angegebenen Schnp. 117° und die Zusammensetzung  $C_{13}H_{16}O_4N_2$ .

0.1929 g Sbst.: 0.4171 g  $CO_2$ , 0.1049 g  $H_2O$ . — 0.1683 g Sbst.: 0.3632 g  $CO_2$ , 0.0946 g  $H_2O$ . — 0.1923 g Sbst.: 16.9 ccm N (18°, 761 mm).

$C_{13}H_{16}O_4N_2$ . Ber. C 59.04, H 6.06, N 19.63.  
Gef. » 58.97, 58.86, » 6.08, 6.29, » 19.41.

Um das Hippurylchlorid direct mit Glykocoll zu kuppeln, löst man 1 Theil des Letzteren in 13.5 ccm Normal-Natronlauge, kühlt auf 0° ab, und fügt dazu abwechselnd in kleinen Portionen und im Laufe von  $\frac{1}{2}$  Stunde unter kräftigem Schütteln 2 g Hippurylchlorid und 14 ccm Normal-Natronlauge. Das Chlorid verschwindet beim Umschütteln sehr rasch. Wenn schliesslich die alkalische Lösung angesäuert wird, fällt das Benzoylglycylglycin als krystallinischer Niederschlag aus, der durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle leicht zu reinigen ist. Die Ausbeute an reinem Präparat betrug 1.2 g oder 50 p.Ct. der Theorie, berechnet auf das angewandte Hippurylchlorid. Schnp. 206° (Curtius fand 206.5°)<sup>2)</sup>.

0.1963 g Sbst.: 20.3 ccm N (18°, 749 mm).

$C_{11}H_{12}O_4N_2$ . Ber. N 11.89. Gef. N 11.81.

### Verwandlung des Benzoyl-glycylglycins in Benzoyl-diglycylglycinester.

Werden 2 g fein gepulvertes Benzoylglycylglycin mit 30 ccm frischem Acetylchlorid übergossen, auf 0° abgekühlt und nach Zusatz von 2.8 g zer

<sup>1)</sup> Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 78 [1904].

<sup>2)</sup> Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 77 [1904].

kleinertem Phosphorpentachlorid kräftig geschüttelt, so geht der grössere Theil in Lösung. Verdampft man dann das schwach gelbe Filtrat möglichst rasch, bei weniger als 0.5 mm Druck, so bleibt ein anfangs gelber, fester Rückstand, der sich bei Zutritt von Luft bald roth färbt. Er muss deshalb stets in Eiswasser gekühlt bleiben und möglichst rasch durch Waschen mit Petroläther von dem anhaftenden Lösungsmittel befreit werden. Man löst dann sofort in kaltem Chloroform und tropft in eine verdünnte und gekühlte, ätherische Lösung von überschüssigem Glykocoll ester unter Schütteln ein.

Der hierbei entstehende, dicke Niederschlag wird abgesaugt, mit Aether gewaschen, abgepresst und mit kaltem Wasser ausgelaugt. Der Rückstand wog 1.1 g und war schwach gelbroth gefärbt. Er wurde in ziemlich wenig heissem Wasser gelöst und die Lösung mit Thierkohle entfärbt. Aus dem Filtrat schied sich beim Erkalten der Benzoyldiglycylglycinester in feinen, farblosen Nadeln ab, die den von Curtius<sup>1)</sup> angegebenen Schmp. 173° (uncorr.) zeigten.

0.1550 g Subst.: 17.4 ccm N (18°, 765 mm).

$C_{13}H_{19}O_5N_3$ . Ber. N 13.11. Gef. N 13.08.

Die Ausbeute war allerdings wenig befriedigend.

#### Salzsaures Leucylchlorid, $C_6H_{13}CH(NH_3Cl).COCl$ .

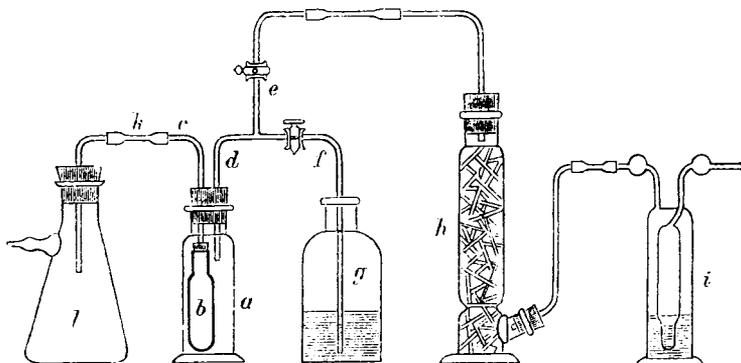
Für die folgenden Versuche diente reines, synthetisches, inactives Leucin, das sorgfältig gepulvert, durch ein feines Sieb getrieben und völlig getrocknet war. 5 g wurden mit 100 ccm frischem Acetylchlorid in einem Glaszylinder von 200 ccm mit gut schliessendem Glasstöpsel übergossen, abgekühlt, dann 8 g (1 Mol.) frisches und rasch zerkleinertes Phosphorpentachlorid zugegeben und 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur auf der Maschine geschüttelt. Der Chlorphosphor verschwindet dabei völlig, und die Aminosäure verwandelt sich in das salzsaure Chlorid, das die Flüssigkeit als sehr feiner, dicker, aber krystallinischer Brei erfüllt. Will man ganz sicher sein, dass das Präparat kein unverändertes Leucin mehr enthält, wie es bei dem Analysenmaterial nöthig ist, so thut man gut, jetzt nochmals 1.5 g zerkleinertes Phosphorpentachlorid zuzufügen und abermals eine Stunde zu schütteln, wobei das Pentachlorid völlig in Lösung geht und allerdings auch ein kleiner Verlust an Leucylchlorid eintritt. Zur Isolirung des Productes ist nur noch Filtration und Auswaschen mit Acetylchlorid und Petroläther nöthig. Dabei muss aber Feuchtigkeit völlig ausgeschlossen sein.

Da die sehr lockere Masse wegen Verstopfung des Filters schlecht zu filtriren ist, so haben nicht allein die gewöhnlichen Filtrationsvorrichtungen, sondern auch der von Beckmann und Paul<sup>2)</sup> für ähnliche Zwecke angegebene Apparat hier versagt. Vorzügliche Resultate erhielt ich dagegen mit den bekannten, von Pukall empfohlenen Thonfiltern und dem beistehenden Apparat, für dessen Zeichnung ich Hrn. Dr. O. Diels zu Dank verpflichtet bin.

<sup>1)</sup> Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 82 [1904].

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. 266, 4 [1891].

*a* ist der Stöpselcylinder, in welchem die Reaction vorgenommen wurde, und *b* der Thonzylinder, in den mittels eines Gummistopfens das Rohr *c*, das fast bis zum Boden reicht, eingesetzt ist. Die Flasche *a* ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen,



durch den einerseits das Rohr *c* und andererseits das Rohr *d* durchgehen. *d* verzweigt sich in *e* und *f*, die beide mit Gashähnen versehen sind; *f* dient dazu, die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* zu entnehmen, *e* führt zu dem mit Phosphorsäureanhydrid gefüllten Thurm *h* und der mit Schwefelsäure gefüllten Flasche *i*, die dazu dienen, einen trocknen Luftstrom in *a* hineinzuleiten. Das Rohr *c* steht durch den Gummischlauch *k* mit der Saugflasche *l* in Verbindung. Wird bei *l* evacuirt, so geht die in der Flasche *a* enthaltene Flüssigkeit durch die Thonzelle und das Rohr *c* dorthin. Gleichzeitig lässt man durch *e* einen langsamen, getrockneten Luftstrom in das Gefäss eintreten. Der grösste Theil des Niederschlags setzt sich fest an die Thonzelle an. Um zu waschen, schliesst man den Hahn bei *e* und öffnet bei *f*, worauf die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* nach *a* übertritt. *g* enthält frisches Acetylchlorid, sie wird später durch eine andere mit Petroläther, der über Phosphorsäureanhydrid getrocknet ist, ersetzt. Damit das Uebersteigen der Waschflüssigkeit erleichtert wird, ist es rathsam, die Flasche *a*, in der bei der hohen Tension der verwendeten Flüssigkeit nur sehr geringer Minderdruck herrscht, durch Einstellen in eine Kältemischung oder durch Aufspritzen von Aether momentan abzukühlen. Noch bequemer wird die Operation, wenn in die Flasche, *a* ein drittes, in der Zeichnung fehlendes Rohr mit Hahn einmündet, das direct mit der Saugpumpe verbunden werden kann. Einmaliges Waschen mit soviel Acetylchlorid, dass die Flasche *a* bis zur Höhe des Niederschlags damit gefüllt ist, und zweimaliges Waschen mit der gleichen Menge Petroläther genügen, um ein analysenreines Präparat zu gewinnen. Zum Schluss wird

scharf abgesogen unter gleichzeitigem Zutritt des getrockneten Luftstromes, dann der Niederschlag möglichst rasch in einen mit Phosphor-pentoxyd beschickten Vacuumexsiccator übergeführt und hier etwa 1 Stunde zur Entfernung der letzten Reste des Petroläthers getrocknet. Das Verfahren ist wohl für manche ähnliche Fälle verwendbar. Selbstverständlich lässt sich hier auch die von Beckmann und Paul angegebene Waschvorrichtung anbringen, wenn man es mit Flüssigkeiten zu thun hat, die nicht wie Acetylchlorid Kautschukschläuche angreifen, oder wenn man mit Substanzen arbeitet, die die Luft nicht vertragen und deshalb in einem indifferenten Gasstrom filtrirt werden müssen.

0.5507 g Sbst.: 0.8406 g AgCl. — 0.1961 g Sbst.: 12.8 ccm N (18°, 754 mm).

$C_6H_{13}ONCl_2$ . Ber. N 7.55, Cl 38.10.

Gef. » 7.48, » 37.74.

Das Salz ist gegen Wärme relativ beständig, erst bei ziemlich hoher Temperatur zersetzt es sich. Es löst sich in kaltem Wasser sofort, und alles Chlor ist dann durch Silberlösung fällbar. Offenbar findet die Verwandlung in Leucin und Salzsäure sogleich statt. Ebenso leicht löst sich das Salz in kaltem Alkohol unter ziemlich starker Wärmeentwicklung. Dabei entsteht eine grosse Menge von Leucinester, der sich nach dem Verdünnen mit Wasser durch Alkali abscheiden lässt. Complicirter ist die Wirkung des Ammoniaks. Trägt man das Salz in eine kalte, ätherische Lösung von Ammoniak ein, so findet sofort Reaction statt, die durch Schütteln und neues Einleiten von gasförmigem Ammoniak ziemlich rasch zu Ende geführt wird. Ueber die Natur der verschiedenen hierbei entstehenden Körper, die zum Theil in Wasser sehr schwer löslich sind, gestatten die bisherigen Beobachtungen kein Urtheil.

Besonders wichtig ist die Verwendbarkeit des Leucylchlorids für den Aufbau der Polypeptide. Sie wurde bisher allerdings nur an einem Beispiel, und zwar durch Combination mit Glykocoll-ester, geprüft. Das erste Product dieser Reaction ist höchstwahrscheinlich Leucyl-glycinester. Da er aber schlecht krystallisirt und leicht in Leucyl-glycinanhydrid übergeht, so habe ich mich damit begnügt, dieses zu isoliren.

5.6 g salzsaures Leucylchlorid, die aus 5 g Leucin frisch bereitet waren, wurden allmählich unter Schütteln in eine kalte, verdünnte (etwa 4-procentige), ätherische Lösung von überschüssigem Glykocoll-ester eingetragen, dann  $\frac{1}{2}$  Stunde auf der Maschine geschüttelt, schliesslich die farblose, krystallinische Masse abgeseugt und mit Aether gewaschen. Ausbeute 9 g. Das Product enthält, neben salzsaurem Glykocoll-ester, wahrscheinlich das Hydrochlorat des Leucyl-

glycinesters. In der doppelten Menge kaltem Wasser löst es sich zum grössten Theil, und auf Zusatz von überschüssigem Ammoniak fällt nichts aus. Wird aber die ammoniakalische Lösung auf dem Wasserbade eingeengt, so beginnt bald die Krystallisation von Leucylglycinanhydrid,  $C_6H_9.HC < \begin{smallmatrix} CO.NH \\ NH.CO \end{smallmatrix} > CH_2$ , das aus dem Ester des Dipeptides durch Abspaltung von Alkohol entsteht. Die erste Krystallisation an fast reinem Anhydrid betrug 1.7 g; die rothe Mutterlauge gab beim Einengen noch 2.1 g derselben Verbindung, aber weniger rein. Die Gesamtausbeute (3.8 g) betrug mithin, berechnet auf die angewandten 5 g Leucin, fast 60 pCt. der Theorie. Zur Reinigung wurde das Product aus heissem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Salzsäure umkrystallisirt, wobei es sich in feinen, farblosen Nadeln vom Schmp. 239° (corr. 244°) abschied, die für die Analyse bei 100° getrocknet waren.

0.1647 g Sbst.: 0.3422 g CO<sub>2</sub>, 0.1224 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 56.47, H 8.24.

Gef. » 56.60, » 8.31.

Die Verbindung ist von Hrn. Brunner im hiesigen Institut schon vorher aus dem Leucylglycin durch Erhitzen gewonnen, aber bisher nicht beschrieben worden. Ich habe mich ferner überzeugt, dass sie aus dem salzsauren Leucylglycinester, der aus dem Dipeptid durch Alkohol und Salzsäure entsteht, bei der oben angegebenen Behandlung in grosser Menge gebildet wird.

Mit diesem Resultat ist der Beweis geliefert, dass die Aminosäuren mit dem Umweg über ihre Chloride zum Aufbau von Polypeptiden benutzt werden können. Versuche, diese wichtige Reaction auf die anderen biologisch wichtigen Aminosäuren auszudehnen, sind bereits im Gange.

Salzsaures Alanylechlorid, CH<sub>3</sub>.CH(NH<sub>2</sub>Cl).COCl.

Die Darstellung war genau dieselbe wie beim Leucinderivat, nur mit anderen Mengenverhältnissen. Auf 1 Theil Alanin wurden 2.5 g Phosphorpentachlorid (berechnet 2.3 g) angewendet. Das Product ist auch hier eine farblose, aus äusserst kleinen Kryställchen bestehende, lockere Masse.

0.1933 g Sbst.: 0.1795 g CO<sub>2</sub>, 0.0866 g H<sub>2</sub>O. — 0.5234 g Sbst.: 1.0340 g AgCl.

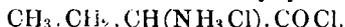
C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>ONCl<sub>2</sub>. Ber. C 25.00, H 4.90, Cl 49.24.

Gef. » 25.32, » 5.01, » 48.85.

Im Capillarrohr rasch erhitzt, beginnt das Salz oberhalb 110° zu sintern, zeigt aber keinen deutlichen Schmelzpunkt. Im übrigen gleicht es durchaus dem Leucinderivat.

Aehnlich dem racemischen Alanin verhält sich das optisch-activer, natürliche *d*-Alanin, aber die Analysen des Productes haben noch keine genau stimmenden Zahlen gegeben.

Salzsaures  $\alpha$ -Amino-butyrylchlorid,



Angewendet wurden 1 g  $\alpha$ -Aminobuttersäure, 2.2 g Phosphor-pentachlorid und 20 ccm Acetylchlorid. Beim Umschütteln schied sich bald ein hübsch krystallisirtes Product aus. Zur Beendigung der Reaction wurde 3 Stdn. auf der Maschine geschüttelt. Ausbeute 1 g.

0.4844 g Subst.: 0.8716 g AgCl.

$\text{C}_4 \text{H}_9 \text{ONCl}_2$ . Ber. Cl 44.9.

Gef. » 44.5.

Versuche, die gleiche Reaction auf die anderen biologisch wichtigen Amino-, Diamino- und Oxy-amino-Säuren zu übertragen, sind bereits im Gange. Heftiger als die freien Säuren reagiren ihre Ester mit Phosphor-pentachlorid. Die dabei entstehenden Chlorverbindungen sind aber noch nicht genügend untersucht. Ich will deshalb speciell nur erwähnen, dass nach Versuchen des Hrn. Umetsuro Suzuki der Cystin-dimethylester, dessen Hydrochlorat  $[\text{—S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_3 \text{Cl}) \cdot \text{CO}_2 \text{CH}_3]_2$  auf die gewöhnliche Art erhalten wird und in langen, farblosen, gegen  $162^\circ$  unter Zersetzung schmelzenden Prismen krystallisirt, in ätherischer Lösung mit  $\text{PCl}_5$  ein solches Derivat als weisses Pulver liefert.

Wie zu erwarten war, sind die salzsauren Aminosäurechloride sehr reactionsfähige Stoffe. Ich habe mich überzeugt, dass sie mit einer ganzen Anzahl anderer Körper leicht in Wechselwirkung treten, und ich zweifle nicht daran, dass man mit ihrer Hülfe das Radical der Aminosäuren in sehr verschiedene Verbindungen einführen kann. Ich beabsichtige, diese Synthesen in ausgedehntem Maasse zu bearbeiten.

Schliesslich sage ich Hrn. Dr. Ferd. Reuter herzlichen Dank für die werthvolle Hülfe, die er bei obigen Versuchen geleistet hat.