

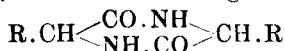
Carbazol. Von dieser Base sind bisher an Acidoxylderivaten nur solche einbasischer Säuren erhalten worden: Acetyl-, Benzoyl-,  $\alpha$ -Brompropionyl-,  $\alpha$ -Brombutyryl- und  $\alpha$ -Bromisovaleryl. Der beschriebene Unterschied vom Diphenylamin ist sehr bemerkenswerth.

634. Emil Fischer und Karl Raske:  
Beitrag zur Stereochemie der 2.5-Diketopiperazine<sup>1)</sup>.

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

(Eingegangen am 13. November 1906.)

Für die Diketopiperazine von der allgemeinen Formel



mit zwei gleichen Substituenten lässt die Theorie bekanntlich wie bei der Weinsäure vier Formen voraussehen, nämlich zwei optisch active Antipoden nebst dem entsprechenden Racemkörper und eine inactive, nicht spaltbare Mesoverbindung, in welcher die Substituenten *trans*-Stellung haben<sup>2)</sup>.

Optisch active Diketopiperazine sind erst in neuester Zeit von einem von uns (F.) aus activen Aminosäuren gewonnen worden<sup>3)</sup>. Dagegen haben C. A. Bischoff und seine Mitarbeiter bei den Gliedern der Klasse, die sich von aromatischen Basen ableiten, öfters die beiden optisch inactiven Formen beobachtet. Eine Zusammenstellung der Fälle findet man in Werner's Lehrbuch der Stereochemie S. 120. Bei den Abkömmlingen der aliphatischen Aminosäuren ist die Existenz der beiden inactiven Formen bisher nicht beobachtet worden, und als wir vor einiger Zeit die zwei stereoisomeren Dipeptide der  $\alpha$ -Aminobuttersäure in die entsprechenden Anhydride zu verwandeln suchten, erhielten wir Producte, die in keiner Beziehung einen Unterschied erkennen liessen<sup>4)</sup>. Da aber die Reaction durch Schmelzung bei höherer Temperatur ausgeführt war, so lag die Möglichkeit vor, dass hier eine molekulare Umlagerung stattgefunden hatte. Da ferner die Diketopipe-

<sup>1)</sup> Diese Mittheilung ist eine Erweiterung der Abhandlung, die wir am 5. April d. J. der Akademie der Wissenschaften zu Berlin vorlegten. Vgl. Sitzungsberichte 1906, 371 und Chem. Centralblatt 1906, II, 59.

<sup>2)</sup> Vgl. Bischoff, diese Berichte 22, 23 und 25; ferner Ladenburg, ebenda 28, 1995 [1895].

<sup>3)</sup> Eine Zusammenstellung der Beobachtungen findet sich diese Berichte 39, 574 [1906]. Vergl. ferner diese Berichte 39, 2893 [1906].

<sup>4)</sup> Ann. d. Chem. 340, 180 [1905].

razine auf's engste mit den wichtigen Dipeptiden theoretisch und experimentell verknüpft sind, hielten wir uns für verpflichtet, diesen Fall einer eingehenden Untersuchung zu unterwerfen.

Anstatt durch Schmelzung haben wir deshalb die beiden Dipeptide durch Behandlung der Ester mit alkoholischem Ammoniak in die Anhydride verwandelt, und so in der That zwei verschiedene Producte erhalten, die wir ebenso wie die Dipeptide vorläufig durch die Buchstaben A und B unterscheiden wollen.

Ein Vergleich dieser beiden reinen Körper mit dem Präparat, das wir früher durch Schmelzung der Dipeptide erhielten, hat es nun ziemlich wahrscheinlich gemacht, dass letzteres ein Gemisch ist, dass also bei der Schmelzung eine gegenseitige Umwandlung der Isomeren stattfindet, die zu einem Gleichgewichtszustand führt.

Wir haben ferner versucht, die beiden Diketopiperazine durch Aufspaltung mit verdünntem wässrigen Alkali wieder in die isomeren Dipeptide zurückzuverwandeln. Dabei findet aber auch, wenigstens in einem Falle, eine Umlagerung statt, denn beide Diketopiperazine geben das gleiche Dipeptid A.

Welches von den beiden Anhydriden die racemische *cis*-Form ist, muss vorläufig unentschieden bleiben, wird sich aber jedenfalls durch die Untersuchung der activen Dipeptide und ihrer Umwandlung in Anhydride feststellen lassen.

Diese Versuche sind indessen bei den Derivaten des Alanins, das in activer Form leichter zugänglich ist, bequemer auszuführen. Bekannt ist hier schon eine active Form, das *d*-Alaninanhydrid, welches aus dem *d*-Alanyl-*d*-Alanin mittels des Esters gewonnen wurde. Viel älter ist ein inactives Anhydrid, das schon vor 40 Jahren von Preu aus Alanin und später von E. Fischer aus dem Ester dargestellt wurde, und aus welchem durch Aufspaltung mit Alkali ein optisch inactives Alanyl-Alanin gewonnen wurde<sup>1)</sup>. Da die Structur dieses inactiven Anhydrids unbekannt und nicht einmal seine Einheitlichkeit sicher festgestellt ist, so haben wir zur Gewinnung eines homogenen inactiven Anhydrids, und zwar der Mesoform, folgenden Weg eingeschlagen.

Durch Kuppelung der linksdrehenden  $\alpha$ -Brompropionsäure mit activem *d*-Alanin und nachträgliche Behandlung des Productes mit Ammoniak wurde das bisher unbekannte, stark nach links drehende *l*-Alanyl-*d*-Alanin bereitet und dieses dann mittels des Esters bei niederer Temperatur in Anhydrid verwandelt. Wie die Theorie voraussehen liess, ist letzteres optisch gänzlich inactiv.

<sup>1)</sup> E. Fischer und K. Kautzsch, diese Berichte 38, 2395 [1905].

Genau der gleiche Versuch mit rechtsdrehender  $\alpha$ -Brompropionsäure und *l*-Alanin gab erst das rechtsdrehende *d*-Alanyl-*l*-Alanin und dann ebenfalls ein inactives Anhydrid, das mit dem ersten identisch war.

Die Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms hat schon so viele Bestätigungen erfahren, dass ähnliche Beobachtungen im allgemeinen nur ein untergeordnetes Interesse finden. Trotzdem scheinen uns die vorstehenden Erfahrungen bei den Diketopiperazinen etwas mehr Beachtung zu verdienen; denn die Fälle, in denen ein optisch actives System durch einfache chemische Verwandlung in eine nicht spaltbare inactive Mesoform mit der gleichen Anzahl von asymmetrischen Kohlenstoffatomen übergeht, sind nicht zahlreich. Sie beschränken sich unseres Wissens auf die Zuckergruppe, und das am sorgfältigsten studirte Beispiel bildet die Entstehung der Schleimsäure aus *d*- und *l*-Galactose, sowie ihre Rückverwandlung durch Reduction in racemische Galactonsäure<sup>1)</sup>.

Dass eine solche Vernichtung der optischen Activität auch durch Ringschluss erfolgen kann, scheint bisher nicht beobachtet worden zu sein.

Die Synthese des neuen inactiven Alaninanhydrids würde also das erste Beispiel dafür sein, und unsere Resultate zeigen deutlich, dass die Inactivität hier gerade so wie bei der Schleimsäure durch den symmetrischen Bau des ganzen Moleküls bedingt ist. Bei dieser Gelegenheit wollen wir übrigens die schon früher gemachte Bemerkung wiederholen, dass die Beweisführung unabhängig von den gebräuchlichen speciellen Hypothesen über die Ursache der Asymmetrie ist.

Von Alanin sind also jetzt bekannt drei optisch-active Dipeptide: *d*-Alanyl-*d*-Alanin, *d*-Alanyl-*l*-Alanin und *l*-Alanyl-*d*-Alanin. Es fehlt nur noch das *l*-Alanyl-*l*-Alanin. Ferner ist bekannt ein inactives Product, welches aus dem alten inactiven Anhydrid durch Aufspaltung mit Alkali entsteht. Da es von Pankreassaft partiell hydrolysirt wird und diese Eigenschaft nur bei dem ersten der frei activen Isomeren beobachtet wurde<sup>2)</sup>, so ist es, falls überhaupt einheitlich, wahrscheinlich die Racemverbindung von *d*-Alanyl-*d*-Alanin und *l*-Alanyl-*l*-Alanin. Zur sicheren Entscheidung der Frage soll seine Synthese aus den beiden activen Formen versucht werden.

Ferner kennt man vom Anhydrid des Alanins die reine active *d*-Verbindung, dann die reine inactive *trans*-Verbindung und endlich das alte inactive Anhydrid, welches in der Hitze aus Alanin oder seinem Ester entsteht. Obschon dieses Product schöne Eigenschaften

<sup>1)</sup> E. Fischer und J. Hertz, diese Berichte 25, 1247 [1892].

<sup>2)</sup> Nach Versuchen, die ich gemeinschaftlich mit Hrn. E. Abderhalden ausführte.

hat und äusserlich den Eindruck einer einheitlichen Substanz macht, so erscheint uns doch nach den Erfahrungen mit den Anhydriden der Aminobuttersäure seine Homogenität nicht ganz sicher, und wir halten eine besondere Untersuchung darüber für nöthig. Dasselbe gilt natürlich für alle Diketopiperazine, die direct aus den racemischen  $\alpha$ -Aminosäuren oder deren Estern bei hoher Temperatur erhalten wurden.

$\alpha$ -Aminobutyryl- $\alpha$ -Aminobuttersäure.

Die beiden Isomeren A und B sind bereits ausführlich beschrieben<sup>2)</sup>. Wir heben aber nochmals die Unterschiede hervor, die bei sonst recht grosser Aehnlichkeit zwischen ihnen bestehen.

1. Schmelzpunkt. Die Schmelzung findet in beiden Fällen unter Abspaltung von Wasser und Bildung von Anhydrid statt; in Folge dessen schwankt der Schmelzpunkt mit der Art des Erhitzens. Trotzdem beobachteten wir bei vergleichenden Versuchen constant zwischen beiden Körpern eine Differenz von 12—13°. Wir haben früher für die Verbindung A den ungefähren Schmelzpunkt 265° und für B ungefähr 250° angegeben. Bei den neueren Bestimmungen, bei denen besonders sorgfältig gereinigte Präparate zur Anwendung kamen, fanden wir ihn bei raschem Erhitzen etwas höher, und zwar für die Verbindung A 265—268° (corr. 272—275°) und für die Verbindung B 253—255° (corr. 260—262°).

2. Krystallform. Aus warmer, wässriger Lösung mit Alkohol gefällt, bildet A stets feine, glänzende Blättchen und B derbe, kurze, zum Theil schräg abgeschnittene, prismatische Nadeln.

3. Kupfersalz. Das Derivat von A ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich und scheidet sich aus heissem Wasser in kleinen, ziemlich derben, flächenreichen, dunkelblauen Krystallen ab. Das Salz B ist auch in kaltem Wasser leicht löslich und krystallisirt daraus in mikroskopisch kleinen, kurzen Prismen.

4. Löslichkeit in Wasser. Für ihre Bestimmung wurden die fein gepulverten Dipeptide mit einer ungenügenden Menge Wasser in einem geschlossenen Rohr aus Jenenser Resistenzglas 20 Stunden im Thermostaten in drehender Bewegung erhalten.

100 g Wasser von 24° lösten vom Dipeptid A 5.4 g.

100 » » » 24° » » » B 29.0 ».

$\alpha$ -Aminobuttersäure-anhydrid (Diäthyl-diketopiperazin).

Die Darstellung aus den beiden Dipeptiden ist für beide Isomere die gleiche. Wir beschreiben sie deshalb ausführlich nur für die Verbindung A.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. 340, 180.

15 g der  $\alpha$ -Aminobutyryl- $\alpha$ -Aminobuttersäure A wurden mit 300 ccm absolütem Alkohol übergossen und durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas ohne Abkühlung verestert. Nachdem in etwa 15 Minuten Lösung eingetreten war, wurde das Einleiten von Salzsäuregas noch 10 Minuten fortgesetzt und dann sofort der überschüssige Alkohol und die Salzsäure bei sehr kleinem Druck unterhalb  $30^{\circ}$  abdestillirt. Um die freie Salzsäure möglichst vollkommen zu entfernen, wurde der Rückstand in etwa 200 ccm absolutem Alkohol gelöst, nochmals im Vacuum eingedampft, dann in eine Schale umgegossen und zwei Tage im Vacuumexsiccator über Natronkalk stehen gelassen.

Das so erhaltene Esterchlorhydrat bildet einen farblosen Syrup. Man kann daraus nach dem Auflösen in wenig Wasser durch Kaliumcarbonat und Natronlauge unter starker Abkühlung den Ester in Freiheit setzen und mit Essigester von den Salzen trennen. Nach dem Verdunsten des Essigesters bleibt der freie Ester als farbloser Syrup zurück. Lässt man ihn längere Zeit (etwa 14 Tage) im Vacuum über Chlorcalcium stehen, so geht er in das Anhydrid über. Viel rascher erfolgt diese Umwandlung durch alkoholisches Ammoniak.

Das aus 15 g Dipeptid A erhaltene  $\alpha$ -Aminobutyryl- $\alpha$ -aminobuttersäureäthylesterchlorhydrat wird mit einigen Cubikcentimetern absolutem Alkohol verdünnt und in 400 ccm alkoholisches Ammoniak, welches stark gekühlt ist, langsam eingetragen. Die anfangs entstehende Trübung löst sich zuerst beim Umschütteln wieder auf, bleibt aber schliesslich bestehen und verschwindet dann erst auf Zusatz von weiterem alkoholischem Ammoniak (etwa 100 ccm). Die klare Lösung wird jetzt bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Nach einigen Stunden beginnt die Krystallisation des Anhydrids und ist nach 24 Stunden beendet. Es wird absaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Die Ausbeute beträgt etwa 7 g. Durch Eindampfen der alkoholischen Mutterlauge im Vacuum und Umkrystallisiren des Rückstandes aus heissem Wasser erhält man eine weitere Menge des Anhydrids. Die Gesamtausbeute schwankte bei den einzelnen Versuchen zwischen 60 und 70 pCt. der Theorie, berechnet auf das angewandte Dipeptid. Zur weiteren Reinigung wird das Präparat aus etwa der 40-fachen Menge heissem Wasser umkrystallisirt.

**Anhydrid A.** Das aus dem alkoholischem Ammoniak ausgefallene Anhydrid besteht häufig aus centimeterlangen, schmalen, schräg abgeschnittenen Tafeln, welche meist büschelförmig angeordnet sind. Beim langsamen Auskrystallisiren aus Wasser bildet es zarte Blättchen, welche theilweise rhombenähnlich und öfters unregelmässig verwachsen sind.

Es schmilzt bei  $270-271^{\circ}$  (corr.  $277-278^{\circ}$ ) zu einer schwach bräunlichen Flüssigkeit und hat einen schwach bitteren Nachgeschmack.

Für die Analyse wurde bei  $110^{\circ}$  getrocknet.

I. 0.1900 g Sbst.: 0.3943 g  $\text{CO}_2$ , 0.1455 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.2653 g Sbst.: 38.2 ccm N ( $16^{\circ}$ , 753 mm). — II. 0.1889 g Sbst.: 0.3913 g  $\text{CO}_2$ , 0.1430 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$C_8H_{14}N_2O_2$  (Mol.-Gew. 170).

Ber. C 56.47, H 8.24, N 16.47.

Gef. » I. 56.60, II. 56.49, » 8.57, 8.47, » 16.67.

Die Löslichkeit in Wasser wurde genau so wie bei den Dipeptiden bestimmt.

100 g Wasser lösten bei 20° 0.32 g Anhydrid A,

» » » » » 24° 0.33 » »

Anhydrid B. Darstellung und Ausbeute sind die gleichen wie bei Verbindung A. Aus dem alkoholischen Ammoniak fällt es häufig in centimeterlangen, dünnen, schräg abgeschnittenen Prismen aus, die aber meist schlecht ausgebildet sind. Beim langsamen Krystallisiren aus Wasser bildet es büschel- und sternförmig verwachsene Nadeln. Es schmilzt bei 259—260° (corr. 266—267°) zu einer schwach bräunlichen Flüssigkeit. Es ist zwar auch noch schwer löslich in Wasser, aber doch wesentlich leichter als A.

100 g Wasser lösten bei 20° 0.91 g Anhydrid B,

» » » » » 24° 1.03 » »

Für die Analyse wurde bei 110° getrocknet.

0.1889 g Sbst.: 0.3914 g  $CO_2$ , 0.1394 g  $H_2O$ . — 0.1934 g Sbst.: 27.6 ccm N (19°, 757 mm).

$C_8H_{14}N_2O_2$  (Mol.-Gew. 170). Ber. C 56.47, H 8.24, N 16.47.

Gef. » 56.51, » 8.26, » 16.40.

Auf Grund dieser zwar nicht grossen, aber constant bleibenden Unterschiede in Schmelzpunkt, Löslichkeit und Aussehen der Krystalle halten wir die Anhydride für verschiedene Körper.

Anders liegt die Sache bei den beiden durch Schmelzung der Dipeptide entstandenen Präparaten<sup>1)</sup>.

Den früher bei 260° angegebenen Schmelzpunkt fanden wir jetzt gewöhnlich bei 261—262° (corr. 268—269°) für beide Körper, und in der Art der Krystallisation war kein Unterschied zu erkennen. Wir haben neuerdings auch die Löslichkeit in Wasser bestimmt und in beiden Fällen fast gleich gefunden. Von dem Präparat aus Dipeptid A lösten 100 g Wasser bei 24° 0.67 und von dem Präparat aus Dipeptid B 0.62 g. Die Zahlen liegen in der Mitte zwischen den Werthen für die Löslichkeit der reinen Anhydride A und B.

Wir vermuthen desshalb, dass es sich hier um ein Gemisch derselben handelt. In Uebereinstimmung damit würden die ganz undeutliche Form der Krystalle stehen und die weitere Beobachtung, dass

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 340, 180. Die Bestimmung der Schmelzpunkte nach der üblichen Methode ist bei dieser hohen Temperatur bekanntlich nicht sehr genau. Wir haben desshalb alle Schmelzpunkte durch directen Vergleich der verschiedenen Präparate ermittelt.

ein Gemisch von gleichen Theilen der beiden reinen Anhydride A und B ungefähr bei derselben Temperatur 261—262° schmilzt. Endlich haben wir gefunden, dass die reinen Anhydride beim Schmelzen beide die gleiche Veränderung erleiden. Reinigt man nämlich die geschmolzene, bräunlich gefärbte Masse durch Umlösen aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle, so zeigt das Product in beiden Fällen denselben Schmp. 261—262° und die undeutliche Krystallform wie das aus den Dipeptiden durch Schmelzung erhaltene Präparat.

**Aufspaltung der beiden Anhydride zu Dipeptid durch Alkali.**

Die Aufspaltung der Diketopiperazine durch wässriges Alkali zum Dipeptid erfolgt beim Glycinanhydrid ausserordentlich leicht, bei dem Alaninanhydrid schon etwas langsamer, und bei dem Leucinanhydrid ist sie bisher noch nicht gelungen. Es war deshalb zu erwarten, dass die Derivate der Aminobuttersäure auch ziemlich schwer von dem Alkali angegriffen werden.

In der That tritt die Reaction bei gewöhnlicher Temperatur so langsam ein, dass wir die Versuche bei 37° ausgeführt haben. Die Bedingungen waren für beide Isomeren genau die gleichen. Wir beschreiben deshalb die Operation nur für die Verbindung A.

2 g sehr fein gepulvertes Anhydrid A wurden mit 132 ccm *n*-Natronlauge und 30 ccm Wasser im Brutraum mit einer Maschine geschüttelt. Nach zwei Tagen war der allergrösste Theil gelöst, und nach 3 Tagen war klare Lösung entstanden. Sie wurde jetzt mit der dem Alkali entsprechenden Menge Jodwasserstoff versetzt, bei sehr geringem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand zur Entfernung von Jodnatrium und etwas unverändertem Anhydrid mehrmals mit absolutem Alkohol ausgekocht. Der ungelöste Theil war das Dipeptid; seine Menge betrug 1.5 g oder 68 pCt. der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde es in wenig Wasser gelöst und durch Alkohol wieder abgeschieden. Das reine Präparat, dessen Menge 1.3 g betrug, zeigte alle Eigenschaften des Dipeptids A. Der Schmelzpunkt lag bei 267—268° (corr. 274—275°). Es krystallisirte in feinen Blättchen, gab das charakteristische, ziemlich schwer lösliche Kupfersalz und zeigte fast die gleiche Löslichkeit in Wasser (5.3, 5.2, 5.1 auf 100 Theile von 24° für drei verschiedene Präparate).

Genau derselbe Versuch mit dem Anhydrid B ausgeführt, gab das gleiche Resultat, auch in Bezug auf Ausbeute, und das Product zeigte wieder alle Eigenschaften des Dipeptids A. Die Löslichkeit in 100 Theilen Wasser von 24° wurde für die verschiedenen Präparate gefunden 5.46, 5.2, 5.1. Zweifellos entsteht also aus beiden Anhydriden durch die Wirkung des Alkalis in reichlicher Menge das Dipeptid A. Sein Isomeres haben wir nicht gefunden, halten es aber

für möglich, dass kleine Mengen desselben sich der Beobachtung entzogen haben.

Zum Schluss geben wir zur bequemen Orientirung eine tabellarische Uebersicht über die Unterschiede bei den beiden Dipeptiden und ihren Anhydriden.

	Dipeptid A	Dipeptid B	Anhydrid A	Anhydrid B	Durch Aufspalten von Anhydrid A erhaltenes Dipeptid	Durch Aufspalten von Anhydrid B erhaltenes Dipeptid
Schmp. (corr.)	272—275°	260—262°	277—278°	266—267°	274—275°	274—275°
Kry- stall- form	feine glänzende Blättchen	kurze, derbe, zum Theil schräg abgeschnittene Nadeln	unregelmässig verwachsene Blättchen	büschel- und sternförmig verwachsene Nadeln	feine, glänzende Blättchen	
Kupfer- salz	in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich; derbe, flächenreiche Krystalle	in kaltem Wasser leicht löslich; mikroskopisch kleine, kurze Prismen			in kaltem Wasser schwer lösliche; derbe, flächenreiche Krystalle	
100 g Wasser lösen bei 24°	5.4	29.0	0.33	1.03	5.2 (Mittel)	5.25 (Mittel)

Man ersieht daraus, dass sowohl beim Aufspalten von Anhydrid A wie von B dasselbe Dipeptid resultirt, dass also beim Sprengen des Piperazinringes eine sterische Umlagerung stattfindet, und dass man somit im Stande ist, das Peptid B auf dem Wege über das Anhydrid in das Isomere zu verwandeln.

#### *l*-Brompropionyl-*d*-alanin.

Die für diese Versuche erforderliche *l*-Brompropionsäure wurde in der früher angegebenen Weise<sup>1)</sup> aus *d*-Alanin mit Hilfe des allgemeinen Verfahrens von Tilden und Marshall und von Walden dargestellt. Es erwies sich aber vortheilhaft, den Rest des überschüssigen Broms, der nach dem Durchblasen von Luft noch in der Flüssigkeit zurückbleibt, nicht mit Quecksilber, sondern mit schwefliger Säure zu entfernen, und die ätherische Lösung der Brompropionsäure nicht mit Natriumsulfat, sondern mit Chlorcalcium zu trocknen. Die Ausbeute war dann etwas besser; sie betrug 75 pCt. der

<sup>1)</sup> E. Fischer und O. Warburg, Ann. d. Chem. 340, 171.



Theorie. Der Drehungswinkel  $\alpha$  des Präparates war bei Verwendung von ziemlich reinem Alanin —  $39^{\circ}$  für  $20^{\circ}$  und Natriumlicht. Bei etwas unreinerem Ausgangsmaterial betrug die Drehungen  $38.6^{\circ}$  und  $36.7^{\circ}$ , während die reinste bisher bekannte *l*-Brompropionsäure im 1 dcm-Rohr den Drehungswinkel  $-45.64^{\circ}$  zeigte.

Trotz dem Gehalt an optischem Antipoden, der zwischen 7.5 und 10 pCt. schwankt, ist diese active Brompropionsäure für die Synthese activer Dipeptide recht brauchbar. Ihre Umwandlung in das Chlorid geschah in der früher angegebenen Weise<sup>1)</sup> durch Erwärmen mit Thionylchlorid.

7.3 g *d*-Alanin werden in 82 ccm *n*-Natronlauge (1 Mol.) gelöst und zu der bis zum beginnenden Gefrieren abgekühlten Lösung 14 g *l*-Brompropionylchlorid (1 Mol.) und 100 ccm gekühlte *n*-Natronlauge abwechselnd in kleinen Portionen unter kräftigem Schütteln eingetragen. Das Chlorid verschwindet rasch, und die Operation kann in 20—25 Minuten beendet sein. Zum Schluss versetzt man mit 37 ccm fünffachnormaler Salzsäure, verdampft die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck zur Trockne und extrahirt den Rückstand mit etwa 200 ccm Aether einige Stunden im Soxhlet'schen Apparat. Schon beim Abkühlen des Aethers scheidet sich ein Theil des Kupplungsproductes aus; der Rest wird durch Verdunsten erhalten. Beigemengte Brompropionsäure, die sich durch ihren starken Geruch verräth, entfernt man am besten durch Verreiben und Waschen mit Petroläther. Die Ausbeute betrug 15 g oder 80 pCt. der Theorie. Zur Reinigung wird das Rohproduct in der vierfachen Menge heissem Wasser gelöst. Beim Abkühlen auf  $0^{\circ}$  fällt ungefähr die Hälfte wieder krystallinisch aus, und durch Verarbeiten der Mutterlauge, die aber nur unter stark vermindertem Druck eingedampft werden darf, gewinnt man noch 4.5 g.

Das so erhaltene Product war nicht ganz rein, denn wir haben bei verschiedenen Präparaten auch nach mehrmaligem Umkrystallisiren stets zu wenig (0.8—0.9 pCt.) Brom gefunden. Auch die specifische Drehung in etwa 5-procentiger, wässriger Lösung bei  $20^{\circ}$  schwankte zwischen  $-60.4^{\circ}$  und  $-63.6^{\circ}$ . Wir haben deshalb auf weitere Reinigungsversuche verzichtet, weil das entsprechende Dipeptid viel leichter rein zu erhalten ist. Unser Präparat schmolz nicht ganz constant gegen  $165^{\circ}$  unter lebhafter Gasentwicklung und Bräunung. Es war sehr leicht löslich in Methylalkohol, etwas schwerer in Aethylalkohol und Aceton, dann successive schwerer in Essigester, Aether und fast unlöslich in Petroläther.

#### *l*-Alanyl-*d*-Alanin.



Werden 7 g *l* Brompropionyl-*d*-Alanin in 35 ccm wässrigem Ammoniak (25-proc.) gelöst und 4 Tage im Thermostaten bei  $25^{\circ}$  aufbewahrt, so ist die Abspaltung des Broms beendet, und beim Verdampfen der Flüssigkeit unter 10—15 mm Druck bleibt eine schwach

<sup>1)</sup> a. a. O.

gelbe, syrupöse Masse zurück. Diese löst sich leicht in absolutem Alkohol. Wird aber die Lösung in einer Platinschale auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol verrieben und wieder verdampft und diese Operation, wenn nöthig, wiederholt, so erhält man bald eine farblose, in Alkohol fast unlösliche Krystallmasse.

Es findet hier also die schon verschiedentlich beobachtete Verwandlung der in Alkohol löslichen Form des Polypeptids in die unlösliche Form statt. Wie es scheint, handelt es sich in solchen Fällen um leicht verwandelbare Isomere. Die unlöslich gewordene Masse des Dipeptids wird mit etwa 50 ccm kaltem Alkohol ausgelaugt, um das Brommammonium zu entfernen. Die Ausbeute betrug dann 3.5 g oder 70 pCt. der Theorie. Zur Reinigung wurde das Dipeptid in der gleichen Menge warmem Wasser gelöst und diese Lösung mit der zehnfachen Menge Alkohol versetzt. Beim Reiben begann bald die Krystallisation des Dipeptids, das nach zweistündigem Stehen bei 0° filtrirt wurde. Leider tritt beim Krystallisiren ein erheblicher Verlust ein, denn aus 3.5 g Rohproduct wurden nur 1.5 g reines Präparat erhalten, hauptsächlich, weil wieder ein Theil des Peptids in die leicht lösliche Form übergeht. Sie bleibt beim Verdampfen der Mutterlauge als Syrup zurück, kann aber durch wiederholtes Abdampfen mit Alkohol wieder in die unlösliche Form umgewandelt werden.

Das *l*-Alanyl-*d*-Alanin krystallisirt unter den oben angegebenen Bedingungen in schmalen, an beiden Enden lancettförmig zugespitzten Blättchen, die theilweise sternförmig verwachsen sind. Es schmilzt bei 262—263° (corr. 269—270°) unter geringer Gasentwicklung zu einer schwach gelben Flüssigkeit, nachdem es einige Grade vorher gesintert ist. Zweifellos verwandelt es sich dabei in ein Anhydrid. Es ist sehr leicht löslich in Wasser, dagegen sehr schwer in Alkohol und fast unlöslich in Aether und Petroläther. Es ist fast geschmacklos. Die wässrige Lösung reagirt schwach sauer und löst Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe. Das Kupfersalz bleibt beim Verdampfen der Lösung als Syrup zurück, erstarrt aber beim längeren Stehen krystallinisch. Es ist nicht allein in Wasser sehr leicht löslich, sondern wird auch von heissem Alkohol in erheblicher Menge aufgenommen und aus dieser Lösung durch Aether als eine hellblaue, amorphe Masse gefällt. Die alkalische Lösung des Dipeptids färbt sich auf Zusatz von Kupfersalzen rein blau.

Die im Vacuum über Chlorcalcium getrocknete Substanz erleidet im Vacuum bei 80° keinen Gewichtsverlust.

0.2076 g Subst.: 0.3415 g CO<sub>2</sub>, 0.1407 g H<sub>2</sub>O. — 0.1895 g Subst. 29.1 ccm N (17°, 750 mm).

$C_6H_{12}N_2O_3$  (Mol.-Gew. 160). Ber. C 45.00, H 7.50, N 17.50.  
Gef. » 44.86, » 7.58, » 17.62.

Eine Lösung vom Gewicht 3.8089 g, welche 0.3299 g Substanz enthielt und das spezifische Gewicht 1.0265 hatte, drehte im 1 dm-Rohr bei 20° Natriumlicht 6.09<sup>0</sup> nach links

Also

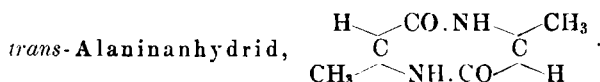
$$[\alpha]_D^{20} - 68.5^0 (\pm 0.4^0).$$

Durch nochmaliges Umkrystallisiren änderte sich die Drehung kaum.

Eine Lösung vom Gewicht 4.2480 g, welche 0.3107 g zwei Mal umkrystallisiertes Dipeptid enthielt und das spezifische Gewicht 1.0222 hatte, drehte im 1 dm-Rohr Natriumlicht 5.10<sup>0</sup> nach links.

Also

$$[\alpha]_D^{20} - 68.22^0 (\pm 0.4^0).$$



1 g *l*-Alanyl-*d*-Alanin wurde mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen und unter Kühlung durch kaltes Wasser Salzsäuregas eingeleitet. Schon nach 4—5 Minuten war das Dipeptid gelöst. Nach 10 Minuten wurde der Alkohol im Vacuum abdestillirt und der Rückstand nochmals in der gleichen Weise mit Alkohol und Salzsäure behandelt, um die Veresterung möglichst zu vervollständigen. Beim Verdampfen der alkoholischen Lösung unter geringem Druck blieb nun das Hydrochlorat des *l*-Alanyl-*d*-Alanin-Aethylesters als Syrup zurück. Es wurde in einigen ccm Alkohol gelöst und langsam in 15 ccm bei 0° gesättigtes, alkoholisches Ammoniak, welches durch eine Kältemischung gekühlt war, eingetragen. Der dabei entstehende Niederschlag löste sich zuerst beim Umschütteln, blieb aber gegen Ende bestehen, und es waren noch 10 ccm alkoholisches Ammoniak erforderlich, um eine klare Lösung zu erhalten. Beim 20-stündigen Stehen bei gewöhnlicher Temperatur schied sich daraus das Anhydrid in hübschen Krystallen ab und war nach dem Absaugen und Waschen mit wenig eiskaltem Wasser fast rein. Die Ausbeute betrug 0.7 g. Aus der Mutterlauge konnte noch 0.1 g erhalten werden, sodass die Gesamtausbeute 90 pCt. der Theorie betrug.

Zur Reinigung genügt einmaliges Umkrystallisiren aus heissem Wasser. Es scheidet sich daraus in feinen, meist sechseckigen, glänzenden Blättchen ab. Beim langsamen Verdunsten einer wässrigen Lösung erreichen die Krystalle eine beträchtliche Grösse, bis zu 1 cm Durchmesser.

Wir verdanken Hrn. Dr. F. von Wolff, Privatdocenten der Mineralogie an hiesiger Universität, folgende Angaben:

»Krystallsystem: rhombisch-holoëdrisch. Die Krystalle bilden dünne, sechsseitige Tafeln mit Zuschärfungen der Kanten durch Domen und Pyramiden. Genauere goniometrische Messungen liessen sich an dem erhaltenen Material nicht anstellen. Auf der Tafelfläche steht die negative Mittellinie senkrecht. Der Axenwinkel ist gross. Er beträgt  $2 \text{ HaNa} = 89^\circ 45'$  in Cassiaöl gemessen, Dispersion der Axen  $\rho < v$ , das Axenbild ist bisweilen gestört. Da das Brechungsvermögen des Cassiaöls ziemlich dem mittleren des Krystalls entspricht, so dürfte der gemessene Winkel dem wahren inneren Axenwinkel des Krystalls recht nahe kommen.«

»Die Auslöschung erfolgt auf der Tafelfläche orientirt zu einer der begrenzenden Kanten und bleibt orientirt, wenn man den Krystall im Drehapparat in Cassiaöl um diese Kante, sowie senkrecht dazu dreht. Mit Alkohol erhält man auf der Tafelfläche rechteckige Aetzfiguren.«

Das Anhydrid schmilzt bei  $270-271^\circ$  (corr.  $277-278^\circ$ ) zu einer gelblichen Flüssigkeit, nachdem es einige Grade vorher gesintert ist. Es löst sich ziemlich schwer in kaltem Wasser. Von heissem Wasser ist etwa die 10-fache Menge erforderlich. Auch in Alkohol ist es schwer löslich.

Die im Exsiccator getrocknete Substanz erleidet im Vacuum bei  $80^\circ$  keinen Gewichtsverlust.

0.1703 g Sbst.: 0.3153 g  $\text{CO}_2$ , 0.1070 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.1766 g Sbst.: 30 ccm N ( $18^\circ$ , 765 mm).

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$  (Mol.-Gew. 142). Ber. C 50.70, H 7.04, N 19.72.  
Gef. » 50.49, » 7.03, » 19.82.

Es ist optisch gänzlich inactiv, denn eine  $2\frac{1}{2}$ -procentige, wässrige Lösung zeigte im 2 dcm-Rohr keine Drehung unter Bedingungen, wo eine Drehung von  $0.02^\circ$  der Beobachtung nicht hätte entgehen können.

Dass die Inactivität nicht zufällig ist, sondern bei der Aufspaltung zum Dipeptid erhalten bleibt, zeigt folgender Versuch.

0.1 g Anhydrid wurde mit 1 ccm Normalnatronlauge bis zur völligen Lösung etwa eine halbe Stunde geschüttelt, dann eine Stunde aufbewahrt und nun die Flüssigkeit mit 1 ccm Normalsalzsäure neutralisirt. Sie zeigte dann keine Spur von Drehungsvermögen.

#### *d*-Brompropionyl-*l*-Alanin.

Das für diese Versuche erforderliche *l*-Alanin wurde nach dem Verfahren von Ehrlich<sup>1)</sup> durch partielle Vergärung von racemischem Alanin mit Hefe gewonnen, denn diese Methode ist bequemer, als die Spaltung des Racemkörpers mittels der Benzoylverbindung. Das *l*-Alanin diente auch als Material für die Gewinnung der *d*-Brompropionsäure, wie später genauer beschrieben wird. Die Kuppelung des *d*-Brompropionylchlorids mit dem *l*-Alanin geschah genau in der

<sup>1)</sup> Biochemische Zeitschrift 1, 8.

gleichen Weise, wie bei dem optischen Antipoden. Ein Unterschied zeigte sich insofern, als das Kuppelungsproduct aus der angesäuerten Flüssigkeit schon ohne Eindampfen beim einstündigen Stehen in Eis in reichlicher Menge ausfiel. Aus der eingeengten Mutterlauge wurde eine zweite Krystallisation erhalten. Bei Anwendung von 13 g *l*-Alanin und 25 g *d*-Brompropionylchlorid betrug die Gesamtausbeute 25 g (oder 77 pCt. der Theorie), welche bei einmaligem Umkrystallisiren aus der vierfachen Menge heissem Wasser 18.2 g reines Präparat lieferten. Das Resultat war also besser, als bei dem optischen Antipoden, und ebenso war das Product nach der Analyse und der optischen Untersuchung reiner. Das erklärt sich durch die grössere Reinheit der angewandten activen Brompropionsäure, von der später noch die Rede sein wird.

Das *d*-Brompropionyl-*l*-Alanin schmilzt beim raschen Erhitzen gegen 170° unter starkem Aufschäumen und Bräunung, nachdem es einige Grade vorher zusammengesintert ist. Es ist leicht löslich in Methylalkohol, etwas schwerer in Aethylalkohol und Aceton, dann successive schwerer in Essigester, Chloroform, Aether und fast unlöslich in Petroläther. Aus heissem Wasser scheidet es sich in Form von octaëderartigen Krystallen ab.

Für die Analyse wurde im Exsiccator über Chlorcalcium und Natronkalk getrocknet.

0.2452 g Subst.: 0.2040 g Ag Br.

$C_6H_{10}O_3NBr$  (Mol.-Gew. 224). Ber. Br 35.71. Gef. Br 35.40.

Eine wässrige Lösung vom Gewicht 15.0315 g, welche 0.3793 g Substanz enthielt und die Dichte  $d_4^{20} = 1.008$  hatte, drehte im 2 dcm-Rohr bei 20° Natriumlicht 3.47° nach rechts.

Also

$$[\alpha]_D^{20} = + 68.21^{\circ} (\pm 0.4^{\circ}).$$

Nach nochmaligem Umkrystallisiren wurde gefunden:

0.3711 g Substanz; Gesamtgewicht der Lösung 13.7680 g,  $d_4^{20} = 1.008$ . Drehung im 2 dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 3.69° nach rechts.

Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 67.91^{\circ} (\pm 0.4^{\circ}).$$

#### *d*-Alanin-*l*-Alanin.

Die Darstellung war dieselbe, wie bei dem optischen Antipoden. Ein kleiner Unterschied zeigte sich nur insofern, als das Dipeptid hier etwas leichter krystallisirte. Dadurch wurde die Reinigung bequemer und auch die Ausbeute besser, denn diese betrug für das Rohproduct etwa 90 pCt. und für das vollkommen reine, hübsch krystallisirte Präparat 60—63 pCt. der Theorie. Dieses bessere Resultat

schreiben wir der schon erwähnten, grösseren Reinheit des hier benutzten Bromkörpers zu.

Bezüglich der Eigenschaften des Dipeptids besteht die allergrösste Aehnlichkeit mit dem Antipoden, sodass wir einfach auf dessen Beschreibung verweisen können. Nur im Schmelzpunkt zeigte sich eine ganz kleine Differenz, denn er wurde hier einige Grade höher, bei 267—268° (corr. 275—276°), beobachtet. Das will aber wenig sagen, da die Schmelzung unter gleichzeitiger Zersetzung und deshalb nicht ganz scharf erfolgt.

Für die Analyse wurde das Dipeptid im Vacuum über Chlorcalcium getrocknet.

0.1707 g Sbst.: 0.2805 g CO<sub>2</sub>, 0.1172 g H<sub>2</sub>O. — 0.2058 g Sbst.: 31.2 ccm N (19°, 748 mm).

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (Mol.-Gew. 160). Ber. C 45.00, H 7.50, N 17.50.

Gef. » 44.82, » 7.68, » 17.21.

Eine wässrige Lösung vom Gewicht 4.6469 g, welche 0.3620 g Substanz enthielt und  $d_4^{20} = 1.022$  hatte, drehte im 1 dcm-Rohr bei 20° Natriumlicht 5.47° nach rechts.

Also

$$[\alpha]_D^{20} = +68.71^\circ (\pm 0.25^\circ).$$

Nach nochmaligem Umkrystallisiren blieb der Werth für die spezifische Drehung fast derselbe.

Eine Lösung vom Gewicht 4.3853 g, welche 0.3249 g zwei Mal umkrystallisirtes Dipeptid enthielt und  $d_4^{20} = 1.022$  hatte, drehte im 1 dcm-Rohr Natriumlicht bei 20° 5.22° nach rechts.

Also

$$[\alpha]_D^{20} = +68.94^\circ (\pm 0.3^\circ).$$

Die Verwandlung in das Anhydrid vollzog sich gleichfalls genau unter denselben Bedingungen und Erscheinungen, wie bei dem Antipoden, und das Product, dessen Ausbeute 95 pCt. der Theorie betrug, zeigte in Bezug auf optische Inactivität, Schmelzpunkt, Löslichkeitsverhältnisse und äussere Form der Krystalle volle Uebereinstimmung mit dem *trans*-Alaninanhydrid.

0.1499 g Sbst.: 0.2795 g CO<sub>2</sub>, 0.0957 g H<sub>2</sub>O. — 0.1543 g Sbst.: 26.8 ccm N (20°, 746 mm).

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (Mol.-Gew. 142). Ber. C 50.70, H 7.04, N 19.72.

Gef. » 50.85, » 7.14, » 19.57.

Hydrolyse des Dipeptids. Ebenso wie bei der Anhydridbildung war auch bei der totalen Hydrolyse des Dipeptids das Verschwinden der optischen Activität zu erwarten, weil gleiche Mengen von *d*- und *l*-Alanin dabei entstehen müssen. Der Versuch hat diesen Schluss bestätigt, und wir wollen ihn genau beschreiben, weil er gleichzeitig als Prüfung der Reinheit des Dipeptids gelten kann.

0 5562 g Dipeptid wurden in 6.5 ccm Salzsäure vom spec. Gewicht 1.1 gelöst. Diese Lösung, welche das Gesamtgewicht 7.8017 g und das spec. Gewicht 1.11 besass, drehte Natriumlicht bei 20° im 1 dcm-Rohr 5.22° nach rechts. Daraus berechnet sich für *d*-Alanyl-*l*-Alanin in 20-procentiger Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} + 65.96^\circ$ . Dass dieser Werth der specifischen Drehung des Dipeptids in wässriger Lösung sehr nahe kommt, ist wohl nur ein Zufall, denn in der Regel haben die Hydrochlorate der Dipeptide ein wesentlich anderes Drehungsvermögen als die Peptide selbst.

Die salzsaure Lösung wurde nun acht Stunden auf 100° erhitzt, was nach früheren Erfahrungen genügt, um bei diesen einfachen Dipeptiden völlige Hydrolyse herbeizuführen. Sie war dann optisch völlig inactiv und hinterliess beim Eindampfen das Hydrochlorat des racemischen Alanins.

#### Darstellung der *d*- $\alpha$ -Brom-propionsäure.

Wie oben schon erwähnt, haben wir die Säure aus dem *l*-Alanin durch Stickoxyd und Brom hergestellt. Entsprechend der Vorschrift zur Umwandlung des *d*-Alanins in *l*-Brompropionsäure<sup>1)</sup> haben wir 20 g reines *l*-Alanin auf einmal verarbeitet. Nur wurde das Gemisch nicht auf 0°, sondern durch eine Mischung von Kochsalz und Eis gekühlt. Ferner wurde der Rest des Broms nicht mit Quecksilber, sondern mit schwefliger Säure entfernt und die ätherische Lösung mit Chlorcalcium getrocknet. Endlich wurde die *d*- $\alpha$ -Brompropionsäure nach Verjagung des Aethers unter 0.1 mm Druck destillirt. Das Resultat war recht befriedigend, denn die Ausbeute an destillirter Säure betrug 71 pCt. der Theorie, und das Präparat zeigte bei 20° im 1 dcm-Rohr eine Drehung von 44.2° nach rechts.

Wenn die früher dargestellte beste *l*- $\alpha$ -Brompropionsäure mit dem Drehungswinkel  $-45.64^\circ$  bei 20° rein war, so würde sich für unser Präparat nur ein Gehalt von ungefähr 3 pCt. an dem optischen Antipoden berechnen.

Vor kurzem hat L. Ramberg<sup>2)</sup> die Gewinnung einer activen Brompropionsäure beschrieben, die ungefähr 80 pCt. der *d*-Säure enthielt. Unser Verfahren liefert nicht allein eine viel reinere *d*-Säure, sondern wir halten es auch in der Ausführung für bequemer. Jedenfalls sind jetzt die früher so schwer zugänglichen Polypeptide mit der Gruppe *d*-Alanyl relativ leicht darzustellen.

<sup>1)</sup> E. Fischer und Warburg, Ann. d. Chem. 340, 171 [1905].

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. 349, 324 [1906].