

150. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. XXIII.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.]

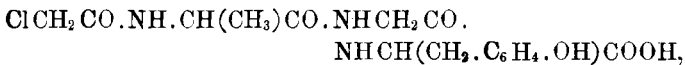
(Eingegangen am 5. März 1908.)

Durch gemäßigte Hydrolyse von Seidenfibroin haben E. Abderhalden und ich ein in Wasser leicht lösliches, aber durch Ammoniumsulfat ausfällbares Produkt gewonnen, das wir nach dem Resultat der totalen Hydrolyse für ein Tetrapeptid von 2 Mol. Glykokoll, 1 Mol. *d*-Alanin und 1 Mol. *l*-Tyrosin glaubten halten zu dürfen¹⁾.

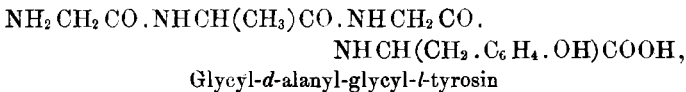
Um diese Ansicht weiter zu prüfen, schien mir die Synthese von Tetrapeptiden aus den 3 Aminosäuren in dem oben angegebenen Verhältnis erwünscht, da ihr Vergleich mit dem Abbauprodukt der Seide am schnellsten über dessen Struktur Aufschluß geben konnte.

Für den Aufbau von Tetrapeptiden stehen uns jetzt verschiedene Methoden zur Verfügung. Wegen der Empfindlichkeit und geringen Krystallisationsneigung der Tyrosinderivate schien es mir aber zweckmäßig, diese Aminosäure zuletzt in das System einzuschieben. Deshalb wurde Tyrosinester kombiniert mit Chloracetyl-*d*-alanyl-glycin. Für die Kupplung diente dessen Chlorid, das sich mit Phosphorpentachlorid und Acetylchlorid verhältnismäßig leicht bereiten läßt.

Der bei der Kupplung entstehende Ester ist rasch verseifbar, und die hierbei gebildete Halogensäure,



wird durch Behandlung mit wäßrigem Ammoniak in das entsprechende Tetrapeptid,



übergeführt.

Dieses hat mit dem Abbauprodukt der Seide wohl manche Ähnlichkeit, denn es wird durch Phosphorwolframsäure und Tannin leicht gefällt, gibt die Millonsche Reaktion, wird durch Pankreassaft hydrolysiert und dreht in wäßriger Lösung schwach nach rechts. Aber es zeigt andererseits in dem Verhalten gegen Ammoniumsulfat, wovon es nur sehr schwer ausgesalzen wird, einen so großen Unterschied, daß man beide Körper für verschieden halten muß. Dieses Resultat ist nicht gerade überraschend; denn die Zahl der strukturisomeren

¹⁾ Diese Berichte **40**, 3544 [1907].

Tetrapeptide obiger Zusammensetzung ist 12, und selbst wenn man die Beobachtung, daß durch partielle Hydrolyse und nachfolgende Anhydridbildung aus dem natürlichen Tetrapeptid Glycyl-alaninanhydrid und Glycyl-tyrosinanhydrid entstehen, mit berücksichtigt, so bleiben doch noch immer 8 Möglichkeiten übrig.

Für die Gewinnung einer zweiten derartigen Substanz schien die Kupplung von α -Brompropionyl-glycyl-glycin mit Tyrosin der geeignete Weg zu sein. Leider zeigten sich aber schon bei der Darstellung des Chlorids Schwierigkeiten. Das inaktive α -Brompropionyl-glycyl-glycin löst sich zwar bei der Behandlung mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid, aber das Chlorid ist so empfindlich, daß seine Reindarstellung bisher nicht gelang. Mit dem Rohprodukt lassen sich allerdings Synthesen ausführen; denn durch Kupplung mit Glykokoll-ester konnte inaktiver Brompropionyl-diglycyl-glycinester und daraus das noch unbekanntes *dl*-Alanyl-diglycyl-glycin gewonnen werden. Aber für die Vereinigung mit dem Tyrosinester ist das unreine Chlorid doch kaum geeignet.

Noch weniger befriedigend war das Resultat bei dem aktiven α -Brompropionyl-glycyl-glycin; denn es löst sich erheblich schwerer in Acetylchlorid oder Chloroform, und es ist bisher überhaupt nicht gelungen, daraus ein für Synthesen geeignetes Chlorid darzustellen.

d-Brompropionyl-glycin.

10.5 g Glykokoll ($1\frac{1}{2}$ Mol.) wurden in 70 ccm 2-fach *n*-Natronlauge gelöst und in der üblichen Weise unter starkem Kühlen und Schütteln mit 16 g (1 Mol.) *d*-Brompropionylchlorid, das aus einer Säure von der Drehung $\alpha = +41.8^\circ$ bereitet war, unter Zugabe weiterer 46 ccm 2-fach *n*-Natronlauge gekuppelt.

Nach beendeter Operation wurde die Lösung mit 30 ccm 5-fach *n*-Salzsäure angesäuert, im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand erschöpfend mit Äther behandelt, wovon ziemlich viel nötig ist, falls außer dem Kochsalz auch das Kupplungsprodukt kristallisiert ist. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die ätherische Lösung eingengt und mit Petroläther gefällt. Beim Reiben kristallisierte das Produkt sofort.

Ausbeute 16.8 g oder 85 % der Theorie, auf Chlorid berechnet. Zur Verwandlung in das Dipeptid ist das Rohprodukt rein genug. Zur Analyse wurde es aus 2 Volumteilen Essigäther umkristallisiert und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

0.1941 g Sbst.: 0.2048 g CO₂, 0.0705 g H₂O. — 0.1976 g Sbst.: 11.2 ccm N, über 33-proz. Kalilauge, (19°, 767 mm). — 0.2001 g Sbst.: 0.1787 g AgBr.

C₅H₈O₃NBr (210). Ber. C 28.57, H 3.84, N 6.67, Br 38.08.

Gef. » 28.78, » 4.06, » 6.60, » 38.00.

Zur optischen Bestimmung diente eine 10-prozentige wäßrige Lösung.

0.3589 g Substanz, Gesamtgewicht der Lösung 3.5457 g. $d^{20} = 1.041$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 18° und Natriumlicht 4.04° ($\pm 0.02^{\circ}$) nach rechts. Demnach $[\alpha]_D^{18} = +38.3^{\circ}$ ($\pm 0.2^{\circ}$).

Da die angewandte Brompropionsäure ungefähr zu 8 % racemisiert war und bei der Kupplung eine weitere Racemisierung stattfinden kann, so ist es nicht ganz sicher, daß dieser Wert einem optisch ganz reinen Präparat entspricht. Für den optischen Antipoden¹⁾ ist früher das Drehungsvermögen leider nicht bestimmt worden.

Die Säure ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und warmem Essigäther, zunehmend schwerer in Äther, heißem Toluol, Chloroform, fast unlöslich in Petroläther. Sie krystallisiert aus Toluol in langen Nadeln, aus Wasser und Essigäther in dünnen Prismen, welche bei $122\text{--}123^{\circ}$ (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit schmelzen, also ebenso wie das früher dargestellte *l*-Brompropionylglycin etwa 20° höher als der Racemkörper.

d-Alanyl-glycin, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}\cdot\text{NHCH}_2\text{COOH}$.

25 g Bromkörper wurden mit 125 ccm wäßrigem 25-prozentigem Ammoniak 2 Tage bei 25° aufbewahrt und dann in der üblichen Weise durch Abdampfen im Vakuum und Fällen mit Alkohol das Dipeptid isoliert. Ausbeute 14.4 g oder 83 % der Theorie.

Das Präparat zeigte genau dieselben Eigenschaften wie das früher auf ganz anderem Wege dargestellte *d*-Alanylglycin²⁾.

Zur Analyse war bei 100° getrocknet.

0.1780 g Sbst.: 0.2669 g CO_2 , 0.1100 g H_2O . — 0.1962 g Sbst.: 32.6 ccm N, über 33-proz. Kalilauge, (20° , 761 mm).

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2$ (146.1). Ber. C 41.08, H 6.90, N 19.18.

Gef. » 40.89, » 6.91, » 19.10.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine 10-prozentige wäßrige Lösung.

0.7022 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.0176 g. d^{20} 1.035. Drehung im 2-dm-Rohr bei 18° und Natriumlicht 10.42° ($\pm 0.02^{\circ}$) nach rechts. Demnach: $[\alpha]_D^{18} + 50.3^{\circ}$ ($\pm 0.1^{\circ}$), während früher³⁾ $[\alpha]_D^{20} + 50.2^{\circ}$ gefunden wurde.

Da das als Ausgangsmaterial für *d*-Brompropionsäure dienende *l*-Alanin jetzt durch die Ehrlichsche Methode der partiellen Vergärung von *d*/*l*-Alanin ziemlich leicht zugänglich ist, so halte ich obiges

¹⁾ E. Fischer und O. Warburg, Ann. d. Chem. **340**, 165 [1905].

²⁾ Diese Berichte **38**, 2921 [1905]. ³⁾ Disse Berichte **38**, 2921 [1905].

Verfahren für bequemer, als die ältere Synthese des Dipeptids mittelst des *d*-Alanylchlorids.

Chloracetyl-*d*-alanyl-glycin.

6 g *d*-Alanyl-glycin (1 Mol.) werden in der berechneten Menge (20.6 ccm) 2-n. Natronlauge gelöst, sehr stark gekühlt und unter kräftigem Schütteln abwechselnd 5.8 g (1.25 Mol.) Chloracetylchlorid und 30.9 ccm 2-n. Natronlauge in 5—6 Portionen zugefügt. Nach dem Verschwinden des Chloridgeruchs wird mit 9 ccm 5-fachnormaler Salzsäure angesäuert, unter stark vermindertem Druck auf etwa $\frac{1}{3}$ des Volumens eingedampft und nach längerem Stehen in Eis der Krystallbrei abgesaugt (6.7 g). Aus der Mutterlauge kann durch völliges Abdampfen und Auslaugen des Rückstandes mit der für die Lösung des Kochsalzes berechneten Menge Wasser noch 1 g gewonnen werden, so daß die Gesamtausbeute 7.7 g oder 84% der Theorie beträgt.

Aus $2\frac{1}{2}$ Teilen heißem Wasser krystallisieren beim Abkühlen in Eis $\frac{2}{3}$ der gelösten Menge in farblosen, dünnen Prismen, während aus der Mutterlauge durch Einengen der Rest gewonnen werden kann. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr schmilzt die Substanz gegen 178° (korr.) unter Zersetzung, nachdem einige Grade vorher Sinterung eingetreten ist. Für die Analyse war im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

0.1235 g Sbst.: 0.1714 g CO₂, 0.0572 g H₂O. — 0.1830 g Sbst.: 19.6 ccm N, über 33-prozentiger Kalilauge (17°, 760 mm.) — 0.1952 g Sbst.: 0.1261 g Ag Cl.

C₇H₁₁O₄N₂Cl (222.6). Ber. C 37.74, H 4.98, N 12.59, Cl 15.93.

Gef. » 37.85, » 5.18, » 12.46, » 15.97.

Zur optischen Bestimmung diene eine 5-prozentige wäßrige Lösung.

0.3300 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 6.6267 g. d_{20}^{20} 1.015. Drehung im 2-dm-Rohr bei 18° und Natriumlicht 5.4° ($\pm 0.02^\circ$) nach links. Mithin: $[\alpha]_D^{18} = -53.4^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

Aus heißem Alkohol, wovon [die Säure etwa 4 Volumteile zur Lösung braucht, krystallisiert sie in mikroskopisch kleinen, feinen Nadelchen, die zu kugligen Konglomeraten verwachsen sind.

In Aceton und Essigäther ist sie recht schwer löslich, in Äther und Ligroin so gut wie unlöslich.

Glycyl-*d*-alanyl-glycin,



3 g Chlorkörper wurden mit 15 ccm 25-prozentigem wäßrigem Ammoniak 3 Tage bei 25° aufbewahrt und dann in der üblichen Weise

durch Abdampfen unter vermindertem Druck und Behandlung des Rückstandes mit heißem Alkohol das krystallisierte Tripeptid isoliert. Die Ausbeute an chlorfreiem Rohprodukt betrug 1.8 g oder 66% der Theorie. Aus der Mutterlauge konnte auch nach Entfernen des Chlorammoniums mit Baryt und Silbersulfat nichts mehr isoliert werden.

Das Tripeptid ist verhältnismäßig schwer löslich in Wasser: Aus der 7-fachen Menge siedendem Wasser krystallisiert bei längerem Stehen in Eis über die Hälfte wieder aus und aus der Mutterlauge kann durch Fällen mit Alkohol der Rest fast vollständig gewonnen werden. Es krystallisiert sowohl aus Wasser, wie aus verdünntem Alkohol in äußerst leichten, feinen Nadelchen ohne Krystallwasser, die beim raschen Erhitzen im Capillarrohr bei 220° anfangen dunkel zu werden und gegen 245° (korr.) unter Schwärzung und Zersetzung schmelzen. Zur Analyse war bei 105° im Vakuum getrocknet.

0.1740 g Sbst.: 0.2651 g CO₂, 0.0993 g H₂O. — 0.2000 g Sbst.: 36.0 ccm N, über 33-prozentiger Kalilauge (20°, 762 mm).

C₇H₁₈O₄N₃ (203.1). Ber. C 41.36, H 6.45, N 20.69.

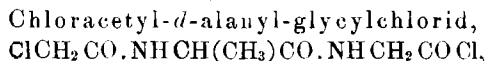
Gef. » 41.55, » 6.38, » 20.72.

Die Bestimmung des Drehungsvermögens wurde einmal mit dem aus Wasser umkrystallisierten und das andere Mal mit dem aus der Mutterlauge durch Alkohol gefällten Produkt ausgeführt und bei dem schwerer löslichen Teil um etwa 1° höher gefunden. Benutzt wurde beide Male eine 4—5-prozentige wäßrige Lösung.

0.3308 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.6753 g. d₂₀²⁰ 1.014. Drehung im 2-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 5.62° (± 0.02°) nach links. Mithin: $[\alpha]_D^{20} = -64.3^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

0.3318 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.5210 g. d₂₀²⁰ 1.016. Drehung im 2-dm-Rohr bei 19° und Natriumlicht 5.69° (± 0.02°) nach links. Mithin: $[\alpha]_D^{19} = -63.5^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

Das Tripeptid ist in verdünnten Säuren und Alkalien sehr leicht löslich, aber unlöslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Mit Alkali und wenig Kupfersulfat gibt es in verdünnter Lösung eine ins Violett spielende Blaufärbung. Von Phosphorwolframsäure wird es in verdünnter, schwefelsaurer Lösung nicht gefällt.



Die Verwandlung des Chloracetyl-*d*-alanyl-glycins in das Chlorid geht um so leichter von statten, je feiner verteilt es ist. In dem hierzu geeigneten Zustand erhält man es durch Lösen in etwa 4 Volumteilen heißem Alkohol, rasches Abkühlen in Eiswasser und starkes Schütteln. Die Lösung erstarrt dann zu einem Brei von feinen Kry-

stallen, die nach einigen Stunden scharf abgesaugt, mit Äther gewaschen, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und durch ein Haarsieb getrieben werden.

Von der so vorbereiteten Substanz werden 4 g mit 20 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid übergossen und in Eiswasser gekühlt. Nach Zufügung von 4.8 g schnell gepulvertem Phosphorpentachlorid wird $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt, wobei klare Lösung eintritt. Dann wird direkt in der geräumigen Schüttelflasche die Lösung unter vermindertem Druck auf etwa die Hälfte eingengt, wobei reichliche Abscheidung von Krystallen erfolgt. Man fällt den Rest durch Zusatz von trockenem Petroläther, filtriert in der üblichen Weise¹⁾ unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit, wäscht mit Petroläther und trocknet eine Stunde im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd.

Die Ausbeute ist befriedigend, denn man erhält etwa ebenso viel Chlorid, wie angewandte Säure. Es ist ein gelbliches, lockeres Pulver, das an der Luft schnell klebrig wird.

Durch Lösen in Wasser und Titrieren mit Silbernitrat und Rhodanammium wurde der Gehalt an leicht abspaltbarem Chlor bestimmt.

0.2972 g Sbst.: 11.4 ccm $\frac{1}{10}$ -n. AgNO₃.

Ber. Cl 14.7. Gef. Cl 13.6.

Man ersieht daraus, daß das Präparat zwar nicht rein ist, aber doch zum größten Teil aus dem gesuchten Chlorid besteht.

Chloracetyl-*d*-alanyl-glycyl-*l*-tyrosinmethylester,
ClCH₂CO.NHCH(CH₃)CO.NHCH₂CO.

NH.CH(CH₂.C₆H₄.OH)COOCH₃.

6.5 g fein gepulverter Tyrosinmethylester²⁾ (2 Mol.) werden mit 75 ccm über Bariumoxyd getrocknetem Aceton übergossen, wobei nur teilweise Lösung erfolgt und in die gut gekühlte Suspension in kleinen Portionen unter Schütteln 3.9 g des zuvor beschriebenen Chlorids eingetragen, wobei allmählich vollständige Lösung eintritt. Die Operation nimmt ungefähr 15 Minuten in Anspruch. Die gelbe

¹⁾ Diese Berichte 38, 1616 [1905].

²⁾ Das Hydrochlorid wurde nach der früheren Vorschrift dargestellt (Ann. d. Chem. 354, 34 [1907]). Für die Bereitung des freien Tyrosinmethylesters diente aber folgendes einfachere Verfahren.

Das Hydrochlorid wird in der 10-fachen Menge Wasser gelöst und unter Kühlung die berechnete Menge starker Natronlauge zugefügt, wobei der freie Ester in fast quantitativer Ausbeute krystallinisch ausfällt. Zur völligen Reinigung braucht er dann nur einmal aus heißem Essigäther unkrySTALLISIERT zu werden.

Lösung, die noch schwach alkalisch reagiert, hinterläßt beim völligen Verdampfen unter stark vermindertem Druck einen gelben, amorphen, blasigen Rückstand, der das Kupplungsprodukt, unveränderten Tyrosinester und andere Substanzen enthält. Will man das erstere krystallisiert erhalten, so ist zunächst ein ziemlich umständlicher Weg nötig. Man löst in etwa 25 ccm Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure, um unveränderten Tyrosinester zu neutralisieren; dann fügt man 8 g Chlornatrium zu. In dem Maße, wie das Kochsalz sich löst, scheidet sich ein dickes, gelbes Öl aus, das zum größeren Teil aus dem Kupplungsprodukt besteht. Nachdem durch Abkühlen auf 0° und Schütteln die Lösung ganz geklärt ist, gießt man die Mutterlauge ab, wäscht mit wenig eiskaltem Wasser, kocht den Rückstand mit Essigäther aus, verdampft die filtrierte Lösung und nimmt dann mit nicht zu viel warmem Wasser wieder auf. Aus dieser Flüssigkeit scheidet sich beim längeren Stehen Chloracetyl-*d*-alanyl-glycyl-*l*-tyrosinmethylester krystallinisch ab.

Ist man einmal im Besitz von Krystallen, so wird die Gewinnung weiterer Mengen viel einfacher. Anstatt die obige wäßrige Lösung des Rohproduktes mit Kochsalz zu fällen, trägt man direkt einige Kryställchen ein und läßt unter öfterem Reiben mehrere Stunden bei 0° stehen. Dabei scheidet sich das Kupplungsprodukt in reichlicher Menge krystallinisch ab. Die Ausbeute betrug 3 g. Aus der Mutterlauge konnten bei mehrtägigem Stehen noch 0.5 g gewonnen werden, so daß die Gesamtausbeute auf 3.5 g oder 54 % der Theorie stieg.

Aus der 15-fachen Menge heißem Wasser krystallisiert der Ester beim langsamen Abkühlen in schönen, schwach gelblichen, häufig rosettenförmig verwachsenen, lanzettförmigen Blättchen, die beim raschen Erhitzen im Capillarrohr zwischen 163° und 164.5° (korr.) zu einer klaren, gelblichen Flüssigkeit schmelzen. Für die Analyse waren sie bei 105° getrocknet.

0.1538 g Sbst.: 0.2893 g CO₂, 0.0778 g H₂O. — 0.1978 g Sbst.: 17.4 ccm N über 33-prozentiger Kalilauge (17°, 770 mm). — 0.2548 g Sbst.: 0.0910 g AgCl.

C₁₇H₂₂O₆N₃Cl (399.65). Ber. C 51.04, H 5.55, N 10.52, Cl 8.87.

Gef. » 51.30, » 5.66, » 10.37, » 8.83.

Der Ester ist in heißem Methylalkohol recht leicht löslich, etwas schwerer in Äthylalkohol, dann zunehmend schwerer in Aceton, Essigäther, Chloroform, Äther, Petroläther. Aus absolutem Alkohol krystallisiert er in kompakten, rhombenähnlichen Formen.

Er reagiert auf Lackmus neutral, ist schwer löslich in kohlensauren Alkalien, leicht dagegen in Natronlauge und zwar mit stark gelber Farbe. Eine verdünnte wäßrige Lösung dreht die Ebene des

polarisierten Lichtes schwach nach links. Eine verdünnte, kalte, wäßrige Lösung färbt sich auf Zusatz von Millons Reagens bei gewöhnlicher Temperatur im Laufe weniger Minuten stark rot, ähnlich wie Tyrosin. Gelindes Erwärmen beschleunigt die Reaktion.

Chloracetyl-*d*-alanyl-glycyl-*l*-tyrosin.

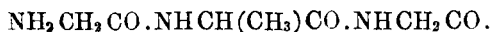
4 g Ester werden mit 20 ccm *n*-Natronlauge übergossen, wobei fast augenblicklich klare, gelbe Lösung eintritt. Nachdem die Lösung 25 Minuten bei Zimmertemperatur gestanden hat, fügt man die äquivalente Menge Salzsäure zu und läßt die Lösung im Vakuumexsiccator eindunsten. Hierbei fällt die Säure zuerst ölig aus, krystallisiert aber im Laufe von 24 Stunden bei öfterem Reiben. Ist man erst im Besitze von Krystallen, so gestaltet sich die Isolierung der Säure noch einfacher; man braucht dann nur das Alkali mit 5-fachnormaler Salzsäure zu neutralisieren und nach dem Einimpfen eines Kryställchens einige Stunden in Eis stehen zu lassen, abzusaugen und mit kaltem Wasser zu waschen, um die Säure in fast quantitativer Ausbeute und genügend reinem Zustande zu gewinnen. Sie ist dann ein schwach gelbliches Pulver, das zur Analyse einmal aus der 8-fachen Menge heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert wurde.

0.1709 g Sbst.: 0.3113 g CO₂, 0.0841 g H₂O. — 0.1830 g Sbst.: 0.0659 g AgCl.

C₁₆H₂₀O₆N₃Cl (385.63). Ber. C 49.79, H 5.22, Cl 9.19.
Gef. » 49.68, » 5.50, » 8.90.

Die Säure krystallisiert aus heißem Wasser in farblosen, feinen, mikroskopischen Nadelchen oder dünnen Prismen, die vielfach zu harten, kugligen Konglomeraten verwachsen sind. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr schmelzen sie bei 206—207° (korr.) zu einer gelben Flüssigkeit, welche sich aber hinterher sofort unter Gasentwicklung zersetzt. Die Substanz ist in heißem Alkohol ziemlich leicht löslich, schwer dagegen in den anderen organischen Lösungsmitteln. Die wäßrige Lösung reagiert stark sauer und gibt mit Millons Reagens besonders bei gelindem Erwärmen eine starke Rotfärbung. Im Gegensatz zum Methylester löst sie sich auch in Natriumcarbonat leicht.

Glycyl-*d*-alanyl-glycyl-*l*-tyrosin,



Eine Lösung von 3 g des zuvor beschriebenen Chlorkörpers in 15 ccm wäßrigem Ammoniak von 25 % blieb 5 Tage bei 25° stehen. Dann wurde unter stark vermindertem Druck zum Syrup verdampft,

dieser mit sehr wenig Wasser in eine Platinschale gespült und nach Zusatz von viel Alkohol eingengt, aber nicht zur Trockne verdampft. Beim wiederholten Zusatz von Alkohol und Konzentrieren der Flüssigkeit trübte sie sich durch Ausscheidung des Tetrapeptids, das anfangs ein zäher Syrup war, aber später, als alles Wasser entfernt war, beim fleißigen Zerkleinern der zähen Masse fest wurde. Jetzt wurde die Mutterlauge, die das Chlorammonium enthielt, durch Filtration entfernt. Die Ausbeute betrug 2.1 g.

Das Produkt enthielt noch wenig Chlor, das aber beim Auskochen mit etwa 200 ccm absolutem Alkohol in Lösung ging und nach völligem Erkalten der Flüssigkeit durch Filtration entfernt wurde.

Zur völligen Reinigung wurde das zurückbleibende Tetrapeptid in recht wenig warmem Wasser gelöst und die filtrierte, noch warme Flüssigkeit mit Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt. Dabei fiel zuerst in geringer Menge eine grau gefärbte, klebrige Masse aus, die nach dem Zusammenballen durch schnelles Abgießen der noch warmen Lösung entfernt wurde. Als jetzt mehr Alkohol zugefügt wurde, schied sich, besonders beim Abkühlen auf 0°, das Tetrapeptid als flockige Masse aus. Man kann auch diese Ausscheidung durch fraktionierte Fällung vornehmen, wobei die zuerst ausfallenden Teile schwach gelb gefärbt sind. Aus der Mutterlauge gewinnt man dann durch Einengen und Zufügen von Alkohol ein rein weißes Produkt, das nach dem Abfiltrieren, Waschen mit Alkohol und Äther und Trocknen im Vakuumexsiccator ein weißes, sehr leichtes Pulver bildet. Die Ausbeute an reinem Tetrapeptid, einschließlich der ersten ganz leicht gefärbten Fraktion, beträgt ungefähr die Hälfte des angewandten Chlorkörpers.

Für die Analyse und optische Bestimmung wurde im Vakuum (10 mm) über Phosphorpentoxyd bei 105° getrocknet.

0.1545 g Subst.: 0.2982 g CO₂, 0.0871 g H₂O. — 0.1826 g Subst.: 19.45 ccm $\frac{1}{10}$ -n. NH₃ (Kjeldahl).

C₁₆H₂₂O₆N₄ (366.21). Ber. C 52.43, H 6.05, N 15.30.

Gef. » 52.64, » 6.31, » 14.92.

0.1312 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 1.3513 g. $d_{20}^{20} = 1.031$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 0.4° nach rechts. Demnach $[\alpha]_D^{20} + 4.0^\circ$.

Die Krystallisation des Tetrapeptids ist bisher trotz seines schönen Aussehens nicht gelungen. Ich zweifle aber kaum daran, daß man bei Verarbeitung größerer Mengen und unter mannigfach variierten Bedingungen auch hier Erfolg haben würde. Wie alle amorphen Produkte und selbst viele krystallisierte Substanzen dieser Klasse hat das Tetrapeptid keinen bestimmten Schmelzpunkt.

Im Capillarrohr rasch erhitzt, beginnt es gegen 200° gelb zu werden, sintert dann allmählich und zersetzt sich gegen 229° (korr.) unter Gasentwicklung und Schwärzung.

Mit Alkali und Kupfersalz gibt es stark die Biuretfärbung und mit Millons Reagens schon bei gewöhnlicher Temperatur nach kurzer Zeit die für das Tyrosin bekannte Rotfärbung. Man darf daraus schließen, daß die im Tyrosin enthaltene Phenolgruppe hier noch vorhanden ist.

Durch Phosphorwolframsäure wird das Tetrapeptid auch bei Gegenwart von Salz- oder Schwefelsäure selbst aus ziemlich verdünnter Lösung gefällt. Ein Überschuß von Phosphorwolframsäure löst aber von dem Niederschlag verhältnismäßig viel wieder auf.

Auch durch Tannin wird das Tetrapeptid aus nicht zu verdünnter, wäßriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur gefällt; dieser Niederschlag wird durch einen Überschuß von Tannin in erheblicher Menge gelöst, und beim Abkühlen in Eiswasser tritt wieder Abscheidung ein.

Durch Ammoniumsulfat wird das Tetrapeptid schwer ausgesalzen. Versetzt man die ziemlich konzentrierte, wäßrige Lösung mit einer bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat, so findet in der Regel erst beim Abkühlen in Eiswasser eine Abscheidung statt. Stärker wird dieselbe, wenn man noch festes Ammoniumsulfat bis zur Sättigung zufügt; aber die Erscheinung ist lange nicht so charakteristisch, als bei dem früher beschriebenen *l*-Leucyl-triglycyl-*l*-tyrosin, oder bei dem von Abderhalden und mir aus dem Seidenfibroin erhaltenen Produkt, das wir ebenfalls als ein Tetrapeptid der gleichen Zusammensetzung glaubten ansehen zu müssen.

Durch frischen Pankreassaft vom Hunde wird das Tetrapeptid ziemlich rasch angegriffen. Eine 10-prozentige Lösung des Tetrapeptids in Wasser, die mit dem halben Volumen frischem Pankreassaft und etwas Toluol versetzt war, hatte nach 12-stündigem Stehen im Brutraum schon einige Krystalle von Tyrosin abgeschieden, und nach 1½ Tagen war eine große Menge der Aminosäure schön krystallisiert ausgefallen.

Fügt man zu der kalten, wäßrigen Lösung des Tetrapeptids, die gleichzeitig Natriumbicarbonat enthält, Bromwasser, so entsteht sofort in reichlicher Menge ein fast farbloses Niederschlag, wahrscheinlich ein Bromsubstitutionsprodukt, das in heißem Wasser löslich ist und beim Erkalten teilweise wieder ausfällt.

Chloracetyl-*d*-alanyl-glycyl-glycinester,



Die Verbindung wurde bei einem Versuch erhalten, der zur vorläufigen Orientierung über die Kupplung des Chloracetyl-*d*-alanyl-glycylchlorids mit Aminosäureestern diente.

Tragt man 1.8 g Chlorid in eine stark gekühlte Lösung von 1.5 g Glykokollester (ca. 2 Mol.) in 20 ccm Chloroform allmählich ein, so findet erst völlige Lösung statt. Aber nach kurzer Zeit scheidet sich ein krystallinischer Niederschlag ab, der nach einstündigem Stehen in einer Mischung von Eis und Salz abgesaugt und mit kaltem Chloroform gewaschen wird. Seine Menge betrug 2.5 g. Er ist ein Gemisch des Kupplungsprodukts mit salzsaurem Glykokollester. Löst man ihn in 6 ccm heißem Wasser, so fällt in der Kälte das Kupplungsprodukt in flachen, meist warzenförmig vereinigten, kleinen Prismen aus. Bei Verarbeitung der Mutterlauge betrug die Ausbeute 1.2 g oder 52% der Theorie.

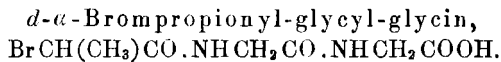
Zur Analyse wurde noch einmal aus Wasser umkrystallisiert und bei 100° getrocknet.

0.1948 g Sbst.: 0.3054 g CO₂, 0.1043 g H₂O.

C₁₁H₁₈O₅N₃Cl (307.5). Ber. C 42.91, H 5.90.

Gef. » 42.76, » 5.99.

Der Ester schmilzt zwischen 165—167° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit. Er löst sich leicht in heißem Alkohol, schwerer in heißem Aceton, Essigester, Chloroform und fast gar nicht in Äther und Ligroin. In der Kälte krystallisiert er aus diesen Lösungen als weiße, äußerst feine, verfilzte Nadeln. In kaltem, verdünntem Alkali löst er sich allmählich unter Verseifung.



Es wurde durch Kupplung von *d*- α -Brompropionsäurechlorid¹⁾ mit Glycylglycin aus Glycinanhydrid nach der für die Synthese des *l*- α -Brompropionyl-glycyl-glycins gegebenen Vorschrift²⁾ erhalten.

Für die Analyse war bei 100° getrocknet.

0.2097 g Sbst.: 0.1469 g AgBr.

C₇H₁₁O₄N₂Br (267). Ber. Br 29.95. Gef. Br 29.82.

Die Substanz zeigte denselben Schmelzpunkt 172° (korr.), sowie die sonstigen Eigenschaften des optischen Antipoden. Die Drehung wurde in alkalischer Lösung bestimmt.

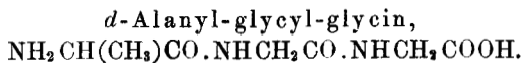
0.3602 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 4.1880 g. $d^{20}=1.049$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2.68° nach rechts. Demnach: $[\alpha]_D^{20} = +29.7^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

0.3654 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 4.0456 g. $d^{20}=1.051$. Drehung bei 20° und Natriumlicht 2.79° nach rechts. Demnach: $[\alpha]_D^{20} = +29.4^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

¹⁾ Dargestellt wie *l*-Brompropionylchlorid. E. Fischer und O. Warburg, Ann. d. Chem. 340, 371 [1905]. Vergl. Darstellung der *d*- α -Brompropionsäure, diese Berichte 39, 3995 [1906].

²⁾ E. Fischer, diese Berichte 39, 2921 [1906].

Für den Antipoden ist das Drehungsvermögen früher nicht ermittelt worden.



Eine Lösung von 6 g Bromkörper in 30 ccm wäßrigem Ammoniak (25-proz.) blieb 4 Tage im Thermostaten bei 25°. Nach dem Verdampfen der Flüssigkeit unter 10—20 mm Druck wurde der glasige Rückstand in 20 ccm warmem Wasser gelöst und durch absoluten Alkohol das Tripeptid als weiße Krystallmasse gefällt. (4.1 g oder 83% der Theorie.) Zur Reinigung löste man es in der 5-fachen Menge heißem Wasser und fügte so lange warmen Alkohol hinzu, als die entstehende Trübung noch eben verschwand; beim Abkühlen schied sich das Tripeptid in feinen, langen Nadelchen aus, die 1 Mol. Krystallwasser enthielten.

0.8488 g Sbst. verloren beim Trocknen bei 100° 0.0702 g H₂O.

C₇H₁₃O₄N₃ + H₂O. Ber. H₂O 8.15. Gef. H₂O 8.27.

Das Krystallwasser entweicht langsam auch bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure. An der Luft wird das Wasser ziemlich rasch wieder aufgenommen.

0.1565 g Sbst. (bei 105° im Vakuum getrocknet): 0.2360 g CO₂, 0.0914 g H₂O. — 0.1450 g Sbst.: 24.7 ccm N über 33-prozentiger Kalilauge (16°, 772 mm).

C₇H₁₃O₄N₃ (203.1). Ber. C 41.35, H 6.45, N 20.69.

Gef. » 41.13, » 6.53, » 20.23.

Das Tripeptid ist sehr leicht löslich in Wasser, fast unlöslich in absolutem Alkohol; mit Kali und Kupfersulfat gibt es eine schwach blauviolette Färbung. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr fängt es gegen 206° an, sich gelb zu färben, schmilzt dann gegen 220° (korr.) unter starkem Schäumen und Schwärzung. Genau ebenso verhält sich der optische Antipode, denn die frühere Angabe, daß er gegen 205° gelb werde und erst gegen 240° schmelze, ist durch einen Schreib- oder Druckfehler entstanden, da die Protokolle die richtige Zahl 220° enthalten.

Zur Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente eine etwa 10-prozentige wäßrige Lösung.

0.3588 g Sbst. (bei 100° getrocknet). Gesamtgewicht der Lösung 3.8694 g. $d^{20} = 1.033$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 3.00° nach rechts. Demnach $[\alpha]_D^{20} = + 31.3^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

1.0628 g wasserfreie Sbst. Gesamtgewicht 10.9776 g. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2-dm-Rohr 6.29° nach rechts. $d^{20} = 1.035$. Demnach $[\alpha]_D^{20} = + 31.4^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

Die Drehung wurde mithin ca. 2° höher gefunden, als bei dem optischen Antipoden, obschon letzterer mehrfach umkrystallisiert war. Das beweist von neuem, wie schwer es ist, solche Peptide optisch rein zu erhalten.

Inaktiver α -Brompropionyl-diglycyl-glycinäthylester,
 $\text{BrCH}(\text{CH}_3)\text{CO} \cdot [\text{NHCH}_2\text{CO}]_2 \cdot \text{NHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$.

Die Verbindung entsteht durch Kupplung von α -Brompropionyl-glycylglycylchlorid mit Glykokollester.

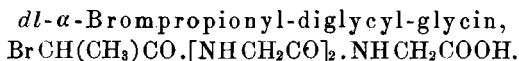
Für die Überführung in das Chlorid wird das Brompropionylglycylglycin aus Alkohol umkrystallisiert, im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet und durch ein Haarsieb getrieben. Übergießt man die so vorbereitete Substanz mit der 10-fachen Menge frisch destilliertem Acetylchlorid und fügt unter Eiskühlung $1\frac{1}{4}$ — $1\frac{1}{2}$ Mol. Phosphorpentachlorid in mehreren Portionen hinzu, so geht sie beim Schütteln bald in Lösung. Es ist wesentlich, gutes Phosphorpentachlorid zu verwenden, da man sonst mehr als $1\frac{1}{2}$ Mol. zur vollständigen Lösung braucht und dadurch die Ausbeute verschlechtert wird. Da das Chlorid wenig Neigung zur Krystallisation hat und beim völligen Verdampfen der Lösung sich teilweise zersetzt, so wird die schwach gelbliche Flüssigkeit zuerst bei 0.3—0.5 mm Druck bis auf $\frac{1}{4}$ des Volumens eingedampft, dann etwa die 3-fache Menge über Phosphorpentoxyd getrocknetes Chloroform hinzugefügt, wieder auf $\frac{1}{4}$ des Volumens eingeeengt und diese Operation noch 1—2-mal wiederholt. Schließlich resultiert eine klare, rote Lösung des Chlorids in Chloroform, die direkt zur Kupplung benutzt wird. Ist das angewandte Phosphorpentachlorid nicht frisch, so entstehen beim Versetzen mit Chloroform harzige Fällungen, welche die Ausbeute beeinträchtigen. Die rote Lösung des Chlorids gibt man allmählich und unter starker Kühlung zu einer Lösung von Glykokollester in Chloroform. Der Glykokollester muß wegen der Anwesenheit von Phosphoroxychlorid in großem Überschuß (5—10 Mol.) angewandt werden, so daß auch zum Schluß der Operation die Lösung noch alkalisch reagiert. Schon nach kurzer Zeit scheiden sich weiße Krystalle aus, welche die Lösung bald breiartig erfüllen. Der Niederschlag wird nach 15-stündigem Stehen im Eisschrank abfiltriert und auf Ton getrocknet; er enthält neben viel Glykokollesterchlorhydrat das gesuchte Kupplungsprodukt. Zur Trennung wird die Masse mit der 3-fachen Menge eiskaltem Wasser ausgelaut, der Rückstand filtriert und auf Ton gestrichen. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt beträgt 50—60 % d. Th., auf das angewandte Brompropionylglycylglycin berechnet. Es wird aus der 6—10-fachen Menge einer Mischung gleicher Volumina Wasser und Alkohol umgelöst; indessen ist die völlige Reinigung mühsam.

0.1989 g Sbst.: 0.1040 g AgBr.

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2\text{Br}$ (352.13). Ber. Br 22.71. Gef. Br 22.25.

Der Ester zersetzt sich beim raschen Erhitzen im Capillarrohr gegen 189° (korr.) unter Schwarzfärbung, ohne zu schmelzen. Aus heißem Wasser oder warmem, verdünntem Alkohol scheidet er

sich in der Kälte rasch als weiße, sehr lockere Masse ab, die unter dem Mikroskop keine krystallinische Struktur zeigt. Läßt man aber mit der Mutterlauge, insbesondere mit verdünntem Alkohol, 1—2 Tage stehen, so nimmt der Niederschlag eine krystallinische Struktur an, und unter dem Mikroskop erkennt man dann äußerst feine, sehr biegsame Nadelchen, die in der Regel konzentrisch angeordnet sind.



Zur Verseifung wurden 4 g Ester mit 12.5 ccm *n*-Natronlauge (1.1 Mol.) geschüttelt, wodurch bald klare Lösung eintrat, dann eine Stunde bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt und mit 12.5 ccm *n*-Salzsäure versetzt. Nach mehrstündigem Stehen in einer Kältemischung schied sich 1 g Säure ab; durch Einengen der Mutterlauge ließen sich noch weitere 1.75 g gewinnen.

Für die Analyse wurde sie mehrfach aus der 8—10-fachen Menge heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umgelöst.

0.1943 g Sbst. 0.2403 g CO₂, 0.0715 g H₂O. — 0.1305 g Sbst.: 14.9 ccm N über 33-prozentiger Kalilauge (17°, 759 mm). — 0.2024 g Sbst.: 0.1164 g AgBr.

C₉H₁₄O₅N₃Br(324.1). Ber. C 33.32, H 4.35, N 12.97, Br 24.67.

Gef. » 33.73, » 4.12, » 13.26, » 24.47.

Die Säure schmilzt bei raschem Erhitzen im Capillarrohr nach vorhergehender Sinterung gegen 174° (korr.) zu einer gelben Flüssigkeit, die sich unter Schäumen zersetzt. Unter dem Mikroskop zeigt sie kugelige Formen; sie ist ziemlich leicht löslich in Wasser, schwerer in Alkohol, sehr schwer in Essigester und Aceton.

Die Bereitung der Säure nach obigem Verfahren ist mühsam, und da auch ihre völlige Reinigung Schwierigkeiten macht, so wird man für die praktische Darstellung die folgende, viel bequemere Methode bevorzugen, die in der Kupplung von Diglycyl-glycin mit α -Brompropionylbromid besteht.

Zu einer Lösung von 10 g Diglycyl-glycin in 26.4 ccm 2-*n*. Natronlauge, die in einer Kältemischung gekühlt ist, gibt man abwechselnd und allmählich 15 g Brompropionylbromid (1¼ Mol.) und 50 ccm 2-*n*. Natronlauge. Nach dem Verschwinden des Chlorids wird durch 15 ccm Bromwasserstoffsäure von 49 % angesäuert. Durch Impfen läßt sich aus der stark gekühlten Flüssigkeit der größte Teil der Säure zur Abscheidung bringen (9 g); eine weitere Menge konnte durch Einengen gewonnen werden. Von beigemengtem Natriumbromid wurde sie durch mehrmaliges Umlösen aus möglichst wenig heißem Wasser und starkes Abpressen befreit. Die Säure zeigte dieselbe kugelige Krystallform, sowie ähnliche Löslichkeitsverhältnisse

wie die aus dem Ester gewonnene. Nur der Schmelzpunkt wurde um einige Grade höher gefunden. Da der Schmelzpunkt wegen der beginnenden Zersetzung nicht scharf ist, so wurden beide Präparate neben einander im Capillarrohr erhitzt: die aus dem Ester erhaltene Säure schmolz gegen 176° (korr.), die andere gegen 180° (korr.).

Für die Analyse wurde im Vakuum bei 100° getrocknet.

0.1643 g Sbst.: 0.2017 g CO₂, 0.0603 g H₂O.

C₉H₁₄O₅N₃Br(324.1). Ber. C 33.32, H 4.35.

Gef. » 33.48, » 4.11.

dl-Alanyl-diglycyl-glycin,
NH₂CH(CH₃)CO.[NHCH₂CO]₂.NHCH₂COOH.

Eine Lösung von 4 g Bromkörper in der 5-fachen Menge wäßrigem Ammoniak (25-proz.) blieb 4—5 Tage im Thermostaten bei 25° stehen. Das gebildete Ammoniumbromid ließ sich nicht durch Schütteln oder Auskochen mit Alkohol vom Tetrapeptid trennen; es wurde deshalb durch Baryt und Silbersulfat in der üblichen Weise entfernt. Das Peptid wurde schließlich aus der wäßrigen Lösung, die im Vakuum stark eingengt war, durch Zusatz von Alkohol als weißes, flockiges Produkt gefällt. (Ausbeute 2.4 g oder 75 % der Theorie.) Zur Reinigung löste man es in der 6-fachen Menge heißem Wasser und fügte warmen Alkohol bis zur bleibenden Trübung hinzu: es schied sich beim Abkühlen und Reiben als feinkristallinisches Pulver ab. Für die Analyse wurde es unter 15 mm Druck bei 100° getrocknet.

0.1494 g Sbst.: 0.2257 g CO₂, 0.0857 g H₂O. — 0.1964 g Sbst.: 29.9 ccm ⁿ/₁₀-H₂SO₄ (Kjeldahl).

C₉H₁₆O₅N₄(260.16). Ber. C 41.51, H 6.20, N 21.54.

Gef. » 41.20, » 6.42, » 21.33.

Das Tetrapeptid löst sich leicht in Wasser, sehr schwer in Alkohol, Aceton und Essigester. Mit Alkali und Kupfersulfat gibt es starke Biuret färbung. Aus konzentrierter wäßriger Lösung fällt es auf vorsichtigen Zusatz von Phosphorwolframsäure als amorphe, klebrige Masse aus; ein Überschuß des Fällungsmittels löst den Niederschlag wieder auf. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr färbt es sich von ca. 220° an braun und zersetzt sich gegen 242° (korr.) unter starkem Schäumen und Schwärzung.

Bei obigen Versuchen bin ich von den HHrn. Dr. Walter Axhausen und Dr. Adolf Sonn unterstützt worden. Der erste hat die Synthese des tyrosinhaltigen Tetrapeptids und der zweite die Darstellung des Alanyldiglycylglycins bearbeitet. Ich sage ihnen für die wertvolle Hilfe auch an dieser Stelle besten Dank.