

Schmelzpunkt gegen 280° (290° korr.) unter Braunfärbung. Aus 50-prozentigem Alkohol krystallisiert das Anhydrid in zu Büscheln vereinigten prismatischen Blättchen. Sie lösen sich in warmem Eisessig und viel heißem Alkohol. Aus letzterem krystallisiert das Anhydrid in feinen, langen Nadeln. In Wasser löst es sich; dagegen ist es in Äther, Chloroform, Essigester, Benzol und Petroläther unlöslich und schwer löslich in *n*-Salzsäure.

Zur optischen Bestimmung wurde ein wiederholt umkrystallisiertes Präparat verwendet.

0.0822 g Subst. in Eisessig gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 8.6833 g. Spez. Gew. 1.05.  $\alpha = 1.73^\circ$  nach rechts im 2-dm-Rohr.  $[\alpha]_D^{20} = + 87.03^\circ$ .

#### 486. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. XXV.<sup>1)</sup> Derivate des Tyrosins und des Amino-acetals.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 10. August 1908.)

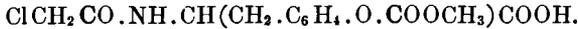
Für den Aufbau komplizierter Polypeptide aus den einfachen Aminosäuren sind die bisher bekannten Methoden ausreichend, wie ich vor Jahresfrist durch die Gewinnung eines Oktadekapeptids gezeigt habe<sup>2)</sup>. Schwierigkeiten ergeben sich aber, wenn es sich darum handelt, Kombinationen der Oxy-aminosäuren in der gleichen Art zu verarbeiten; insbesondere stört hier die Empfindlichkeit des Hydroxyls gegen Phosphorpentachlorid. Dieser Übelstand ist mir besonders fühlbar geworden bei dem Versuch, die verschiedenen isomeren Tri- und Tetrapeptide zu gewinnen, die das Tyrosin mit dem Glykoll und dem Alanin bilden kann, und deren Entstehung man bei der partiellen Hydrolyse des Seidenfibroins erwarten darf. Ich habe deshalb nach einem Mittel gesucht, den schädlichen Einfluß des im Tyrosin enthaltenen Hydroxyls vorübergehend zu beseitigen, und gefunden, daß die Einführung der Carbomethoxygruppe für diesen Zweck sehr geeignet ist, denn diese läßt sich jederzeit leicht wieder durch Verseifung entfernen.

Die Brauchbarkeit des Verfahrens wurde zunächst für das Chloracetyl-*l*-tyrosin geprüft. Durch Schütteln seiner alkalischen Lö-

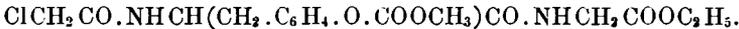
<sup>1)</sup> Diese Mitteilung ist eine Erweiterung der Abhandlung, die ich am 21. Mai 1908 der Akademie der Wissenschaften zu Berlin vorlegte. Vergl. Sitzungsberichte 1908, 542 und Chem. Zentralbl. 1908, II, 314.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 40, 1754 [1907].

sung mit Chlorkohlensäuremethylester entsteht in fast quantitativer Ausbeute das Chloracetyl-carbomethoxy-*l*-tyrosin:



Dieses läßt sich durch Behandlung mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid verhältnismäßig leicht in das entsprechende Säurechlorid verwandeln. Bringt man letzteres dann in ätherischer oder Chloroform-Lösung mit Glykokollester zusammen, so entsteht der Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosyl-glycinäthylester:



Glücklicherweise findet bei diesem Ester schon durch Schütteln mit kaltem verdünntem Alkali totale Verseifung statt, wobei die Carbomethoxygruppe als Methylalkohol und Kohlensäure abgespalten wird und in befriedigender Ausbeute das Chloracetyl-tyrosyl-glycin:



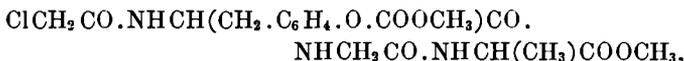
resultiert.

Daraus entsteht endlich durch Amidierung Glycyl-tyrosyl-glycin:

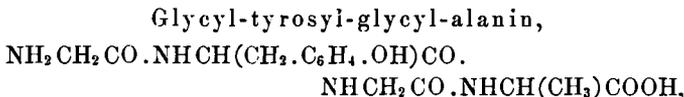


Auf dieselbe Art konnte durch Verwendung von Glycyl-*d*-alaninester an Stelle des Glykokollesters ein

Chloracetyl-carbomethoxytyrosyl-glycyl-*d*-alanin-methylester,



erhalten werden, und dieser lieferte bei der Verseifung und nachträglichen Amidierung ein bisher allerdings nur im amorphen Zustand bekanntes Tetrapeptid, das ich nach der Bildungsweise für



halte.

Ich zweifle nicht daran, daß man mit dieser Methode zahlreiche bisher unzugängliche Polypeptide des Tyrosins bereiten kann, und hoffe, daß sie sich auch auf andere Oxy-aminosäuren, z. B. Serin, übertragen läßt.

Leider erfolgt während der Synthese eine starke Racemisierung der Tyrosingruppe, denn der Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosyl-glycinester und die daraus dargestellten weiteren Produkte erwiesen sich sämtlich als optisch inaktiv.

Die aus dem Glycyl-*d*-alaninester hergestellten Präparate sind zwar optisch aktiv, aber ihre Homogenität ist sehr fraglich; denn wenn das Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosylchlorid zum größten Teil racemisiert ist, so müssen bei der Kupplung mit dem aktiven Glycyl-*d*-alaninester zwei verschiedene optisch aktive Körper entstehen. Da ferner die Ausbeute an Kupplungsprodukt hier ebenso gut ist wie beim Glykokollester, so halte ich es für sehr wahrscheinlich, daß das später beschriebene Präparat auch nach dem Umkrystallisieren ein solches Gemisch von zwei Stereoisomeren war. Dasselbe gilt natürlich auch für das daraus bereitete Tetrapeptid.

Im Anschluß hieran erwähne ich noch die Carboalkyloxyderivate des Formyl-tyrosins, deren Chloride ebenfalls für die Synthese von Polypeptiden benutzt werden sollen. Diese Versuche sind aber noch nicht abgeschlossen.

Reduktionsprodukte der Polypeptide sind bisher nicht bekannt. Man könnte daran denken, solche Körper, die an Stelle des endständigen Carboxyls die Aldehydgruppe enthalten, durch Reduktion der Ester mit Natriumamalgam in ähnlicher Weise darzustellen, wie kürzlich der Glykokollester gleichzeitig von mir<sup>1)</sup> und von C. Neuberg<sup>2)</sup> in Aminoaldehyd oder Aminoacetal übergeführt wurde.

Da aber diese Reduktion nur schlechte Ausbeuten liefert, so habe ich einen anderen Weg eingeschlagen, der viel leichter zum Ziele führt und der Bildung von Dipeptiden aus Halogenacyl-amino-säuren entspricht.

Bringt man Amino-acetal mit Chlor-acetylchlorid in ätherischer Lösung zusammen, so findet sofort Umsetzung statt, und es entsteht neben salzsaurem Aminoacetal in reichlicher Menge ein sirupöses Produkt, das zwar nicht analysiert wurde, das aber nach seiner Entstehungsweise und seinem ganzen Verhalten sehr wahrscheinlich Chloracetyl-aminoacetal ist:



Bei der Behandlung mit Ammoniak tauscht es nämlich das Halogen gegen Amid aus und verwandelt sich in eine Base, die nach der Analyse der Salze die Zusammensetzung  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}_2$  hat und die ich für Glycyl-aminoacetal



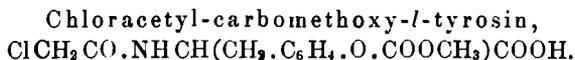
halte.

Sie zeigt manche Ähnlichkeit mit dem Aminoacetal selbst. Insbesondere wird sie von Säuren sehr leicht in ein Produkt verwandelt,

<sup>1)</sup> Diese Berichte 41, 1019 [1908].    <sup>2)</sup> Diese Berichte, 41, 956 [1908].

das die Fehlingsche Lösung stark reduziert und wahrscheinlich Glycyl-aminoaldehyd, oder mit anderen Worten, der Aldehyd des Glycyl-glycins ist.

Diese Synthese läßt sich ohne Zweifel in mannigfaltiger Weise variieren, und von den Produkten darf man mit Hinblick auf die Reaktionsfähigkeit der Aminoaldehyde einerseits und der Dipeptide andererseits merkwürdige Umwandlungen erwarten.



13 g Chloracetyl-*l*-tyrosin werden in 100 ccm *n*-Natronlauge (2 Mol.) gelöst, in einer Kältemischung gut gekühlt und 5 g (1.1 Mol.) chlorkohlensaures Methyl zugefügt. Das Öl verschwindet bei kräftigem Schütteln fast augenblicklich, und nach 5—10 Minuten ist auch der Geruch des Chlorids verschwunden. Beim Ansäuern mit 10 ccm 5-fach-normaler Salzsäure fällt das Reaktionsprodukt als dickes Öl aus, das sofort mit dem doppelten Volumen Äther ausgeschüttelt wird. Die Ätherauszüge werden mit Natriumsulfat flüchtig getrocknet und auf dem Wasserbade stark eingeengt. Durch Zufügen von Petroläther wird das Produkt ölig abgeschieden, krystallisiert aber beim Reiben nach kurzer Zeit. Nach dem Absaugen, Waschen mit Petroläther und Trocknen im Exsiccator betrug die Ausbeute 14.8 g oder 94% der Theorie. Löst man das Produkt in 50 Tln. heißem Wasser, so fällt es beim Abkühlen erst als Öl aus, krystallisiert aber bei längerem Stehen in Eis als mikroskopische, äußerst dünne, langgestreckte und zugespitzte, farblose Blättchen, die vielfach wie Nadeln aussehen. Sie wurden zur Analyse im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

0.1980 g Sbst.: 0.3600 g  $\text{CO}_2$ , 0.0808 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.1747 g Sbst.: 0.0795 g AgCl.

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{NCl}$ . (315.57) Ber. C 49.43, H 4.47, Cl 11.23.  
 Gef. » 49.59, » 4.56, » 11.25.

Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr schmilzt die Substanz bei 116° (korr.) zu einer klaren farblosen Flüssigkeit, nachdem schon einige Grade vorher Sinterung eingetreten ist.

Sie löst sich leicht in Alkohol, Essigäther, Aceton, schwerer in Chloroform, Toluol, Äther, noch schwerer in kaltem Wasser, und ist fast unlöslich in Petroläther.

Mit Millons Reagens gibt die wäßrige Lösung selbst in gelinder Wärme keine Rotfärbung; erst bei stärkerem und längerem Erhitzen tritt eine schwache Rosafärbung ein.

Durch überschüssiges Alkali wird die Carbomethoxygruppe sehr leicht angegriffen. Löst man nämlich die Substanz in etwa 4 Mol. *n*-Alkali, so erfolgt beim Ansäuern stürmische Kohlensäureentwicklung.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine Lösung in absolutem Alkohol:

0.3250 g Sbst. Gesamtgewicht der Lösung 3.2561 g.  $d = 0.8273$ . Drehung bei  $20^\circ$  und Natriumlicht im 1-dm-Rohr +  $4.02^\circ (\pm 0.02)$ . Mithin:

$$[\alpha]_D^{20} = +48.7^\circ (\pm 0.2).$$

#### Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosylchlorid.

4 g der zuvor beschriebenen rohen Säure, die durch Fällen der ätherischen Lösung mit Petroläther erhalten ist, werden fein gepulvert, durch ein Haarsieb getrieben, dann mit 20 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid übergossen und in die durch Eis gekühlte Suspension 3 g (1.1 Mol.) schnell gepulvertes, frisches Phosphorpentachlorid eingetragen. Beim Schütteln tritt im Laufe weniger Minuten klare Lösung ein. Das Acetylchlorid und Phosphoroxychlorid müssen unter stark vermindertem Druck schnell verdampft werden. Der schwach gelb gefärbte, ölige Rückstand wird zweimal mit trockenem Petroläther gewaschen und dann mit etwa 25 ccm trockenem Äther aufgenommen. Von einer geringen Menge ungelöster Substanz wird schnell filtriert und die klare, gelbliche, ätherische Lösung des Chlorids direkt zur Synthese verwendet. Manchmal scheidet sich das Chlorid beim Abdampfen des Acetylchlorids krystallisiert ab. In diesem Zustand ist es in Äther schwer löslich, und man tut dann besser, nach dem Waschen mit Petroläther in Chloroform zu lösen und diese Flüssigkeit in der später beschriebenen Weise für die Kupplung mit Glykokollester zu verwenden.

#### Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosyl-glycinäthylester, $\text{ClCH}_2\text{CO.NHCH}(\text{CH}_2.\text{C}_6\text{H}_4.\text{O.COOCH}_3)\text{CO.NHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ .

In eine durch Eis gekühlte Lösung von 5.2 g (4 Mol.) Glykokollester in etwa 75 ccm trockenem Äther wird die ätherische Lösung des Chlorids allmählich unter starkem Schütteln eingetragen. Man muß darauf achten, daß die ätherische Lösung stets alkalisch bleibt, und deshalb, wenn nötig, noch mehr Glykokollester zufügen. Zusammen mit dem salzsauren Glykokollester fällt das Kupplungsprodukt als gelbliche, klebrige Masse aus, die aber beim langen Reiben allmählich fest wird. Nach dem Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen entfernt man aus dem Gemisch das Glykokollesterhydrochlorid durch Verreiben mit 10 ccm Wasser. Zur Reinigung wird

das Rohprodukt in etwa der 8-fachen Menge heißem Alkohol gelöst und nach dem Filtrieren das 2—3-fache Volumen heißes Wasser zugefügt. In der Regel krystallisiert der Ester dann sofort aus.

Die Ausbeute ist ziemlich schwankend und betrug im besten Falle 50% der Theorie, berechnet auf das angewandte Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosin.

Ist das zu verwendende Säurechlorid krystallisiert, so benutzt man, wie oben erwähnt, zum Lösen nicht Äther, sondern ganz trocknes Chloroform, von dem auf 4 g ursprüngliches Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosin etwa 20 ccm zur Anwendung kommen. Diese Lösung trägt man allmählich in eine durch Kältemischung gekühlte Lösung von 6 g Glykokollester in 75 ccm Chloroform ein. Das Kupplungsprodukt bleibt hier gelöst, während Glykokollesterchlorhydrat auskrystallisiert. Etwa 30 Minuten nach beendigter Eintragung wird die filtrierte Chloroformlösung unter vermindertem Druck stark eingedampft, dann mit Petroläther gefällt und der klebrige Niederschlag nach Entfernen der Mutterlauge mit Wasser durchgerührt, wobei er durchgehends krystallinisch erstarrt. Zur Reinigung wird ebenfalls aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Die Ausbeute war hier etwas besser; sie betrug an reinem Produkt bis 60% der Theorie.

Zur Analyse wurde nochmals aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0.1956 g Sbst.: 0.3650 g CO<sub>2</sub>, 0.0944 g H<sub>2</sub>O. — 0.1261 g Sbst.: 0.0458 g Ag Cl.

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>Cl. (400.63) Ber. C 50.92, H 5.28, Cl 8.85.

Gef. » 50.89, » 5.40, » 8.98.

Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr beginnt der Ester gegen 125° zu sintern und schmilzt bei 130° (korrigiert) zu einer klaren Flüssigkeit.

Er ist in Essigäther, Chloroform, Aceton und warmem Alkohol leicht löslich, schwerer in Benzol, sehr schwer in Äther und Wasser, selbst in der Hitze, fast unlöslich in Petroläther. Er krystallisiert aus Alkohol oder Benzol in feinen verfilzten Nadelchen, aus heißem Wasser in schmalen, konzentrisch verwachsenen Spießeln. Weder die alkoholische, noch die Chloroformlösung zeigte eine Drehung des polarisierten Lichtes.

In Soda ist er unlöslich, wird aber durch überschüssiges Alkali allmählich unter Verseifung und Kohlensäureabspaltung gelöst.

Chloracetyl-tyrosyl-glycin,

ClCH<sub>2</sub>CO.NHCH(CH<sub>2</sub>.C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.OH)CO.NHCH<sub>2</sub>COOH.

3 g des Esters werden möglichst fein gepulvert und mit 34 ccm Normalnatronlauge (4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Mol.) auf der Maschine geschüttelt. Unter starker Gelbfärbung löst sich die Substanz in 1—1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden. Wird jetzt die braugelbe Flüssigkeit mit 7 ccm 5-fach normaler Salzsäure

angesäuert, so findet lebhaftere Gasentwicklung statt, und die Farbe wird etwas heller. Impft man mit einigen Krystallen, die von einer früheren Darstellung herrühren, so scheiden sich im Laufe einer Stunde beim Kühlen mit Eis und häufigem Reiben 1.6 g oder etwa 70% der Theorie leicht gelb gefärbte Kryställchen ab. Zur Gewinnung der ersten Krystalle ist es ratsam, die wäßrige Lösung unter stark vermindertem Druck völlig zu verdampfen, den Rückstand mit warmem Essigäther aufzunehmen, vom Kochsalz zu filtrieren und die Lösung abzdunsten. Der sirupöse Rückstand krystallisiert bei längerem Reiben zum größten Teil, und die nun schwer löslichen Krystalle werden mit wenig kaltem Essigäther digeriert, abgesaugt und mit kaltem Essigäther gewaschen.

Zur Reinigung wird die Säure aus der 10-fachen Menge heißen Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert; sie fällt beim Abkühlen in kleinen, vierseitigen, fast rechteckigen Platten aus, die zuweilen wie Prismen aussehen. Zur Analyse waren sie bei 100° getrocknet.

0.1855 g Sbst.: 0.3368 g CO<sub>2</sub>, 0.0802 g H<sub>2</sub>O. — 0.1807 g Sbst.: 0.0815 g AgCl.

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Cl. (314.58) Ber. C 49.59, H 4.80, Cl 11.27.

Gef. » 49.52, » 4.84, » 11.15.

Die Säure schmilzt beim raschen Erhitzen im Capillarrohr bei 188—190° (korr.) unter Gasentwicklung und Rotfärbung.

Sie ist in reinem Zustand so gut wie farblos; gewöhnlich aber haben die Krystalle einen Stich ins Gelbe. Von heißem Wasser verlangt sie ungefähr 10 Teile zur Lösung und scheidet sich beim Abkühlen auf 0° zum allergrößten Teil aus. In Methylalkohol ist sie leicht löslich, in Äthylalkohol etwas schwerer, recht schwer in Essigäther, Chloroform, Toluol, und fast unlöslich in Äther.

Eine 3-prozentige wäßrige Lösung zeigte keine wahrnehmbare Drehung.

#### Glycyl-tyrosyl-glycin,



1 g Chloracetyl-tyrosyl-glycin wird in 5 ccm 25-prozentigem, wäßrigen Ammoniak gelöst und bei 25° aufbewahrt. Nach 2½ Tagen ist alles Halogen abgespalten. Die gelbe Lösung wird unter vermindertem Druck völlig abgedampft und der Rückstand mit etwa 15 ccm absolutem Alkohol behandelt. Er bildet dann ein rötlichgelbes Pulver, das abgesaugt und mit Alkohol gewaschen wird. Die Ausbeute an diesem fast völlig halogenfreien Produkt betrug 0.75 g oder 80% der Theorie. Es wird zur Reinigung in etwa 8 Teilen heißem Wasser gelöst und durch Zusatz des fünffachen Volumens absoluten Alkohols wieder abgeschieden. Es bildet dann mikroskopisch kleine,

wetzsteinähnliche Kryställchen, die zur Analyse bei 15 mm Druck über Phosphorpentoxyd bei 100° getrocknet wurden.

0.2028 g Sbst.: 0.3927 g CO<sub>2</sub>, 0.1088 g H<sub>2</sub>O. — 0.1182 g Sbst.: 11.9 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. NH<sub>3</sub> (Kjeldahl).

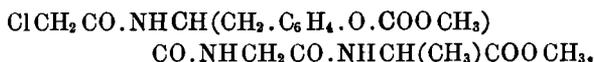
C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (295.16). Ber. C 52.85, H 5.80, N 14.24.

Gef. » 52.81, » 6.00, » 14.10.

Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr beginnt das Tripeptid sich bei 205° gelb zu färben und zersetzt sich gegen 221° (korr.) unter Gasentwicklung und Braunfärbung.

Löst man es in etwa der achtfachen Menge warmem Wasser und kühlt auf 0° ab, so scheidet es sich wieder in reichlicher Menge als weißes, sehr feines, mikrokristallinisches Pulver ab. Die wäßrige Lösung wird durch eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung nicht gefällt. Die nicht gar zu verdünnte, mit etwas Schwefelsäure versetzte, wäßrige Lösung gibt mit Phosphorwolframsäure einen amorphen Niederschlag, der sich in der Wärme ziemlich leicht löst. Die wäßrige Lösung zeigt sehr schön die Millonsche Reaktion. Sie löst Kupferoxyd beim Kochen langsam und färbt sich dabei rein blau. Die alkalische Lösung gibt auf Zusatz von wenig Kupfersulfat eine ins Violett spielende Blaufärbung. Die 2 $\frac{1}{2}$ -prozentige, wäßrige Lösung zeigte im 2-dcm-Rohr keine wahrnehmbare Drehung.

Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosyl-glycyl-*d*-alanin-methylester.



Für die Bereitung des Glycyl-*d*-alaninmethylesters diente folgendes Verfahren:

Glycyl-*d*-alanin<sup>1)</sup> wird mit 5 Volumteilen trockenem Methylalkohol und gasförmiger Salzsäure unter mäßiger Kühlung verestert und das Hydrochlorid des Esters durch Zufügung von etwa dem gleichen Volumen trockenem Äther abgeschieden. Das Salz krystallisiert beim Reiben bald und bildet dünne, farblose, seideglänzende Prismen, die beim raschen Erhitzen im Capillarrohr nach vorheriger

<sup>1)</sup> E. Fischer und A. Schulze, diese Berichte 40, 946 [1907]. Um die dort angegebene, ziemlich schlechte Ausbeute (45% an Rohprodukt) zu verbessern, wurde das bei der Darstellung des Dipeptids entstehende Chlorammonium zuerst in der gewöhnlichen Weise mit Barythydrat und Silbersulfat entfernt und dann das Dipeptid durch mehrmaliges Abdampfen mit Alkohol in den krystallisierten Zustand übergeführt. Die Ausbeute stieg dadurch auf 65—68% der Theorie an reinem Produkt.

Sinterung bei etwa 160—162° (korr.) schmelzen, und zur Analyse im Vakuum über Natronkalk getrocknet wurden.

0.2146 g Sbst.: 10.66 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. AgNO<sub>3</sub>.

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>·HCl (196.57). Ber. Cl 18.03. Gef. Cl 17.61.

Das Salz ist in Wasser spielend leicht, auch in Alkohol recht leicht löslich.

5 g des salzsauren Esters werden in 15 ccm trockenem Methylalkohol gelöst, unter Kühlung die zur Bindung des Chlors nicht ganz ausreichende Menge Natriummethylat, in Methylalkohol gelöst, zugegeben und nun der Methylalkohol unter stark vermindertem Druck möglichst schnell abgedampft, wobei die Temperatur des Bades nicht höher als 25° sein soll. Es ist nicht nötig, daß der Methylalkohol dabei völlig entfernt wird. Durch Ausschütteln mit etwa 30 ccm stark gekühltem, trockenem Chloroform wird der Dipeptidester von dem abgetrennten Kochsalz getrennt und diese Lösung des Esters nach dem schnellen Filtrieren sofort zur Synthese benutzt.

Das schnelle Arbeiten ist unbedingt erforderlich, da der freie Methyl ester äußerst leicht in Glycyl-*d*-alaninanhydrid übergeht, manchmal schon fast vollständig beim Abdampfen des Methylalkohols. Aus demselben Grunde ist ein Überschuß von Natriummethylat zu vermeiden, weil es die Anhydridbildung befördert.

In die Lösung des Dipeptidesters wird nun die chloroformische Lösung des Chloracetyl-carbomethoxy-tyrosylchlorids, das aus 2 g Chloracetyl-carbomethoxytyrosin bereitet ist, allmählich unter starker Kühlung eingetragen, bis die Reaktion der Lösung neutral ist. Nach einstündigem Stehen der gelben Lösung bei Zimmertemperatur wird das Chloroform unter stark vermindertem Druck verdampft und der gelbe, sirupöse Rückstand mit Methylalkohol aufgenommen. Da diese Lösung noch erhebliche Mengen Chloroform enthält, das die Krystallisation des Kupplungsprodukts erschwert, so wird sie nochmals im Vakuum abgedampft, wieder mit Methylalkohol aufgenommen und in gelinder Wärme mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Beim Abkühlen und Reiben tritt bald Krystallisation ein. Das gelbbraun gefärbte Rohprodukt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute war außerordentlich schwankend, im besten Falle betrug sie bei den oben angegebenen Mengen 1.7 g. Außerdem tritt bei der Reinigung ein nicht unerheblicher Verlust ein.

Hierzu wird die Substanz in der 25—30-fachen Menge heißem Methylalkohol gelöst und nach längerem Kochen mit Tierkohle und Filtrieren das gleiche Volumen Wasser zugefügt. Der Ester scheidet sich dann meist in ziemlich undeutlichen, kugelförmigen Krystallaggre-

gaten, manchmal aber in schönen, konzentrisch verwachsenen, kurzen Prismen ab, die beim raschen Erhitzen im Capillarrohr gegen 200° sintern und gegen 208° (korr.) zu einer gelblichen Flüssigkeit schmelzen. Trotz der Behandlung mit Tierkohle sind die Krystalle nicht farblos, sondern haben immer einen Stich ins Gelbe. Zur Analyse waren sie im Vakuumexsiccator und dann kurze Zeit bei 100° getrocknet.

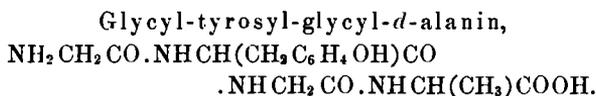
0.1477 g Sbst.: 0.2686 g CO<sub>2</sub>, 0.0714 g H<sub>2</sub>O. — 0.1679 g Sbst.: 0.052 g AgCl.

C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>Cl (457.66). Ber. C 49.82, H 5.28, Cl 7.75.

Gef. » 49.60, » 5.41, » 7.66.

Der Ester ist in Wasser außerordentlich schwer löslich, verhältnismäßig leicht in Methyl- und Äthylalkohol, Aceton, noch leichter in Chloroform.

Von verdünnter Natronlauge wird er allmählich unter Verseifung mit gelber Farbe gelöst. Die Bestimmung des Drehungsvermögens unterblieb, weil die optische Homogenität des Präparats zweifelhaft ist.



Die Verseifung des oben beschriebenen Esters gelingt leicht durch überschüssige *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur. Aber es war bisher nicht möglich, das Verseifungsprodukt, das nach aller Analogie und auch nach seinen Eigenschaften in der Hauptmenge Chloracetyl-tyrosyl-glycyl-*d*-alanin zu sein scheint, zu krystallisieren.

1.5 g Chloracetyl-carbomethoxytyrosyl-glycyl-*d*-alaninmethylester wurden fein gepulvert und mit 15 ccm (4½ Mol.) *n*-Natronlauge in einer Schüttelflasche bei Zimmertemperatur auf der Maschine geschüttelt. Die Masse wird bald stark gelb, und allmählich gehen die Krystalle vollständig in Lösung. Nach ½—¾ Stunden ist die Reaktion beendet. Die gelbbraune Lösung wird nun mit 15 ccm *n*-Schwefelsäure genau neutralisiert, wobei viel Kohlensäure entweicht, und die wieder heller gewordene Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck verdampft. Durch 80-prozentigen Alkohol wird das Natriumsulfat von der Säure getrennt und die alkoholische Lösung nach dem Filtrieren unter stark vermindertem Druck verdampft. Der zurückbleibende braune Sirup kann direkt zur Gewinnung des Tetrapeptids verwendet werden. Zu dem Zweck wird er in 15 ccm wäßrigem Ammoniak von 25% gelöst, 5 Tage bei 25° aufbewahrt, dann die bräunliche Flüssigkeit im Vakuum vollständig verdampft und der Rückstand mit möglichst wenig Wasser in ein Platinschälchen gespült. Durch mehrmaliges Abdampfen mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade erhält man schließlich das Tetrapeptid als ein schwach

bräunliches, in absolutem Alkohol schwer lösliches, lockeres Pulver, und die Ausbeute beträgt ungefähr 0.7 g. Das Rohprodukt ist noch keineswegs rein. Es wird deshalb in 1 ccm Wasser gelöst und mit Alkohol versetzt, bis eine bleibende Trübung entsteht. Nach einigem Stehen in der Kälte setzt sich eine braune, klebrige Masse ab, welche die Hauptverunreinigungen enthält. Die nur noch schwach gefärbte Mutterlauge scheidet auf Zusatz von mehr Alkohol das Tetrapeptid als schwachgelb gefärbtes Pulver ab, das abgesaugt und mit wenig Alkohol und Äther gewaschen wird. Seine Menge betrug 0.25 g, während aus der Mutterlauge durch Einengen und Aufnehmen mit wenig Alkohol noch 0.15 g gewonnen werden konnten.

Das Präparat war frei von Chlor, enthielt aber noch eine kleine Menge Asche (etwa 1%). Es wurde zur Analyse bei 100° und 12 mm Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet und gab dann folgende, leidlich stimmende Werte, die sich auf aschefreie Substanz beziehen:

0.1075 g Sbst.: 0.2060 g CO<sub>2</sub>, 0.0617 g H<sub>2</sub>O. — 0.0943 g Sbst.: 10.1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. NH<sub>3</sub>.

C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (366.21). Ber. C 52.43, H 6.05, N 15.30.

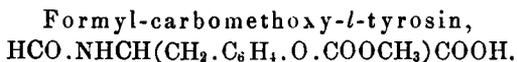
Gef. » 52.26, » 6.42, » 15.01.

Das Tetrapeptid war ein amorphes, schwach gelbliches Pulver, das sich in Wasser spielend, in Alkohol schwer, aber doch noch merklich löst. In den anderen organischen Lösungsmitteln ist es sehr schwer löslich. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr bläht es sich zwischen 180° und 190° stark auf und färbt sich intensiv gelb. Erst gegen 225° (korr.) tritt Dunkelbraunfärbung und allmähliche Verkohlung ein.

Die wäßrige Lösung des Tetrapeptids gibt mit Alkali und Kupfersulfat eine starke Biuret färbung. Mit Millons Reagens färbt sie sich, namentlich beim gelinden Erwärmen, dunkelrot.

Die konzentrierte, wäßrige Lösung wird in der Kälte durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung gefällt. Die Substanz gleicht darin den Albumosen. Bei größerer Verdünnung bleibt aber die Fällung aus oder wird sehr schwach. Die nicht zu verdünnte schwefelsaure Lösung wird durch Phosphorwolframsäure gefällt.

Die Eigenschaften des Tetrapeptids bieten keine Gewähr für seine Einheitlichkeit. Aus den in der Einleitung dargelegten Gründen halte ich es vielmehr für wahrscheinlich, daß es ein Gemisch von Stereoisomeren ist.



20.9 g entwässertes Formyltyrosin<sup>1)</sup> werden in 200 ccm *n*-Natronlauge gelöst, die Lösung stark gekühlt und 10.3 g chlorkohlen-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 40, 3716 [1907].

saures Methyl (1.1 Mol.) zugefügt. Bei kräftigem Umschütteln ist das Chlorid nach 5 Minuten völlig verschwunden. Beim Ansäuern mit 40 ccm 5-*n*-Salzsäure erstarrt das Ganze zum Krystallbrei. Nach  $\frac{1}{2}$ -stündigem Stehen in Eis wird abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Die Ausbeute ist fast quantitativ.

Aus 10 Teilen heißem Wasser krystallisiert die Substanz in glänzenden, großen, äußerst dünnen Blättchen, die sich aber beim längeren Stehen in kompakte, scharfkantige Krystalle umwandeln. Diese sintern bei 142° und schmelzen bei 147° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit.

Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0.1702 g Sbst.: 0.3367 g CO<sub>2</sub>, 0.0796 g H<sub>2</sub>O. — 0.2034 g Sbst.: 9.5 ccm N über 33-proz. KOH (26°, 759 mm).

C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>N (267.11). Ber. C 53.91, H 4.90, N 5.25.  
Gef. » 53.95, » 5.23, » 5.22.

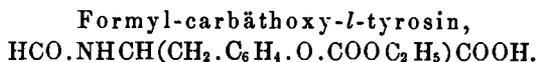
Für die optische Bestimmung diente eine etwa 5-prozentige alkoholische Lösung.

0.3517 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 6.6481 g,  $d = 0.802$ . Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2-dcm-Rohr 5.66° ( $\pm 0.04^\circ$ ) nach rechts. Mithin  $[\alpha]_D^{20} = + 66.7^\circ (\pm 0.4^\circ)$ .

Da aber das zur Darstellung des Formyltyrosins verwendete, aus Seide bereitete *l*-Tyrosin schon Racemkörper enthielt, so ist der Wert nicht als endgültig zu betrachten.

Die Substanz ist in kaltem Wasser sehr schwer löslich, leicht in Alkohol und Aceton, zunehmend schwerer in Essigäther, Chloroform, Benzol, Äther und Petroläther.

Sie löst sich leicht in verdünnter Sodalösung und wird von Alkali fast momentan partiell verseift. Beim Ansäuern findet starke Entwicklung von Kohlensäure statt, und das regenerierte Formyltyrosin krystallisiert beim Impfen aus.



Es wird genau wie die Methylverbindung unter Anwendung von 11.8 g chlorkohlensaurem Äthyl dargestellt. Beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure fällt ein Öl aus, das aber bald krystallinisch erstarrt. Aus 10 Teilen siedendem Wasser krystallisiert die Verbindung in manchmal zentimeterlangen, dünnen, seideglänzenden Nadeln, die gegen 173° zu sintern beginnen und bei 177—179° (korr.) unter Gasentwicklung schmelzen.

Sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton, etwas schwerer in Essig äther, sehr schwer in kaltem Wasser, Chloroform und Äther.

Zur Analyse wurde sie im Exsiccator getrocknet.

0.1682 g Sbst.: 0.3428 g CO<sub>2</sub>, 0.0808 g H<sub>2</sub>O. — 0.1223 g Sbst.: 5.5 ccm N über 33-proz. KOH (20°, 767 mm).

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>N (281.12). Ber. C 55.49, H 5.38, N 4.98.

Gef. » 55.58, » 5.37, » 5.21.

In alkoholischer Lösung dreht die Substanz ebenfalls stark nach rechts.



Zu einer gut gekühlten Lösung von 16 g Aminoacetal (2 Mol.) in 50 ccm trockenem Äther gibt man allmählich 6.8 g frisch destilliertes Chloracetylchlorid (1 Mol.), das durch 40 ccm Äther verdünnt ist. Das Chlorid verschwindet sofort, und bald beginnt die Abscheidung von salzsaurem Aminoacetal. Das von der weißen Krystallmasse abgesaugte ätherische Filtrat wird mit 10 ccm gesättigter Kochsalzlösung durchgeschüttelt, der Äther abgehoben und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdunsten des Äthers bleibt ein fast farbloses Öl zurück. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Das Öl läßt sich bei 0.1 mm Druck ohne wesentliche Zersetzung destillieren, wenn man kleine Mengen anwendet und möglichst schnell erhitzt. Der Siedepunkt liegt nicht weit über 100°. Bei längerer Dauer des Erhitzens zersetzt sich das Öl. Es ist frisch destilliert farblos. Bei starker Abkühlung durch flüssige Luft oder ein Gemisch von Alkohol und flüssiger Luft wird es fest. Es löst sich ziemlich leicht in kaltem Wasser und wird durch starkes Alkali oder Kochsalz wieder abgeschieden. Analysiert wurde es nicht. Aber es unterliegt keinem Zweifel, daß es der Hauptmenge nach Chloracetyl-aminoacetal ist.

Um es in die Aminoverbindung zu verwandeln, wird es mit der 5-fachen Menge wäßrigem Ammoniak von 25% im geschlossenen Rohr 2 Stunden auf 100° erhitzt. Das Öl, das in der kalten Flüssigkeit nur teilweise löslich ist, verschwindet dabei. Man verdampft nun unter geringem Druck zur Trockne. Der rötlichgelb gefärbte Rückstand erstarrt in der Kälte fast vollständig und enthält neben Chlorammonium viel salzsaures Glycylaminoacetal, das sich direkt durch Auslaugen mit warmem Essigäther isolieren läßt.

Ähnlich verläuft die Amidierung bei Anwendung von trockenem flüssigem Ammoniak. Das Chloracetylaminoacetal löst sich dann sofort, und nach 4-tägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur ist die Reaktion beendet. Beim Verdunsten des Ammoniaks bleibt ein Gemisch eines dicken Sirups

mit Krystallen zurück. Man löst in Wasser und erhält beim Verdampfen unter vermindertem Druck ein ähnliches Produkt wie bei Anwendung von wäßrigem Ammoniak.

Zur Isolierung des Glycyl-aminoacetals schüttelt man das Gemisch von Hydrochlorid und Chlorammonium mit konzentrierter Kalilauge, fügt noch festes Ätzkali zu und extrahiert die ölig abgeschiedene Base mehrmals mit Äther. Die ätherischen Auszüge werden mit festem Ätzkali getrocknet. Beim Verdunsten der filtrierten ätherischen Lösung bleibt das rohe Glycylaminoacetal als gelbrotes Öl zurück, das schon bei gewöhnlicher Temperatur teilweise erstarrt und in einer Kältemischung vollständig fest wird. Durch starkes Trocknen der ätherischen Lösung mit Ätzkali, Klären mit Tierkohle und Verdampfen erhält man es in farblosen Krystallen, die sich aus warmem Ligroin leicht umkrystallisieren lassen, bei ungefähr 45° schmelzen und an der Luft zerfließen. Sie wurden bisher nicht analysiert. Die Base ist in Wasser sehr leicht löslich, wird aber daraus durch starkes Alkali ölig gefällt. Sie reagiert stark alkalisch und reduziert die Fehlingsche Lösung, wenn sie rein ist, auch in der Wärme gar nicht. Dagegen gibt sie mit Fehlingscher Lösung und starker Natronlauge einen fast farblosen, krystallinischen Niederschlag, der sich aus der warmen alkalischen Flüssigkeit umkrystallisieren läßt. In Wasser ist dieser Körper mit blauer Farbe leicht löslich, wird aber durch konzentriertes Alkali wieder gefällt. Er scheint eine eigentümliche Kupferverbindung zu sein, deren Zusammensetzung noch festgestellt werden muß.

Von den Salzen des Glycylaminoacetals habe ich nur das Hydrochlorid und das saure Oxalat näher untersucht. Das erste ist neben Chlorammonium und etwas freier Base in dem Rückstand, der beim Verdampfen der ursprünglichen ammoniakalischen Lösung der Rohbase zurückbleibt, enthalten.

Beim Auslaugen mit warmem Essigäther geht es in Lösung und scheidet sich beim Abkühlen wieder in Krystallen ab. Es löst sich dann schwerer in Essigäther, läßt sich aber doch daraus umkrystallisieren. Aus der freien Base gewinnt man dasselbe Salz, indem man die gekühlte ätherische Lösung sehr vorsichtig mit einer alkoholischen oder ätherischen Lösung von Chlorwasserstoff versetzt. Zur Reinigung kann man es auch in wenig Alkohol lösen und durch Äther fällen.

Es bildet farblose, mikroskopische, schräg abgeschnittene Blättchen, die meist zu gezackten Konglomeraten verwachsen sind. Es schmilzt nicht ganz konstant unter Gasentwicklung gegen 119° (korrigiert) zu einer dunklen Flüssigkeit, nachdem schon einige Grade vorher Sinterung eingetreten ist. Es ist äußerst leicht löslich in Wasser, auch von Alkohol wird es leicht aufgenommen; erheblich schwerer löslich ist es in Essigäther und noch viel schwerer in Benzol und Chloroform. Das Umkrystallisieren muß immer rasch

und mit Vorsicht geschehen, weil das Salz leicht zersetzlich ist. So erleidet es schon beim Erwärmen der wäßrigen Lösung ziemlich rasch eine partielle Verseifung der Acetalgruppe, und die Flüssigkeit reduziert dann in der Wärme die Fehlingsche Lösung, was das reine Hydrochlorid bzw. das daraus entstehende Glycylaminoacetal nicht tut.

Für die Analyse dienen zwei verschiedene Präparate, von denen das eine aus dem Rohprodukt durch direktes Umkrystallisieren aus Essigäther und das andere aus der freien Base durch Neutralisation mit Salzsäure in ätherischer Lösung dargestellt und durch Umkrystallisieren aus Alkohol und Äther gereinigt war. Getrocknet wurde im Vakuumexsiccator über Phosphor-pentoxyd.

0.1857 g Sbst.: 0.2874 g CO<sub>2</sub>, 0.1420 g H<sub>2</sub>O. — 0.1763 g Sbst.: 19.2 ccm N (20°, 762 mm) (über 33-proz. KOH). — 0.1734 g Sbst.: 7.5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. AgNO<sub>3</sub>.

C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Cl (226.61). Ber. C 42.36, H 8.45, N 12.36, Cl 15.64.

Gef. » 42.21, » 8.55, » 12.54, » 15.33.

Schöner als das Hydrochlorid ist das saure Oxalat. Es fällt als farb- loser, voluminöser Niederschlag aus, wenn man die Base in alkoholischer Lösung mit der für das saure Salz ausreichenden Menge Oxalsäure zusammenbringt. Zur Reinigung wird es ungefähr in der 40-fachen Gewichtsmenge heißem Alkohol rasch gelöst; beim Abkühlen scheidet es sich sofort in feinen weißen Nadelchen aus, die für die Analyse im Vakuumexsiccator über Phosphor-pentoxyd getrocknet wurden.

0.1506 g Sbst.: 0.2377 g CO<sub>2</sub>, 0.0973 g H<sub>2</sub>O. — 0.1427 g Sbst.: 12.3 ccm N (20°, 761 mm) (über 33% KOH).

C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> (280.17). Ber. C 42.83, H 7.19, N 10.00.

Gef. » 43.05, » 7.22, » 9.91.

Das Salz hat ebenfalls keinen scharfen Schmelzpunkt; es beginnt gegen 140° dunkel zu werden und schmilzt gegen 150° unter Schäumen. Es löst sich sehr leicht in Wasser und reagiert stark sauer. Erheblich schwerer wird es von heißem Alkohol aufgenommen, noch schwerer von den übrigen organischen Solvenzien.

Das Pikrat krystallisiert ebenfalls. Bringt man die rohe Base mit Pikrinsäure in Benzol zusammen, so fällt es gewöhnlich zunächst als Öl aus, das aber bald erstarrt, und das Salz läßt sich dann aus warmem Essigäther leicht in feinen gelben Nadelchen erhalten.

Das Glycylaminoacetal wird von Säuren ebenso leicht verändert wie das Aminoacetal. Es genügt, das neutrale Hydrochlorid oder das saure Oxalat in verdünnter, wäßriger Lösung einige Minuten auf 100° zu erwärmen, um schon eine deutliche Veränderung hervorzurufen; die Flüssigkeit färbt sich dabei gelb und reduziert dann die Fehlingsche Lösung in der Wärme recht stark. Dieselbe Verwandlung wird bei gewöhnlicher Temperatur durch überschüssige Salzsäure hervorgerufen. Als eine Lösung von 0.5 g salzsaurem Glycylaminoacetal in 2 ccm 20-prozentiger Salzsäure 2 Stunden bei

Zimmertemperatur gestanden hatte, war die Wirkung auf Fehlingsche Lösung sehr stark, und beim raschen Verdunsten der Flüssigkeit im Vakuumexsiccator über Natronkalk und Phosphorpenoxyd blieb eine amorphe, braunrote, in Wasser äußerst leicht, in absolutem Alkohol aber gar nicht lösliche Masse zurück, die ebenfalls die Fehlingsche Flüssigkeit in der Wärme sehr stark reduzierte. Diese Eigenschaft sowie die Verschiedenheit von dem salzsauren Aminoaldehyd, der in Alkohol löslich ist, deuten darauf hin, daß das Produkt Glycylglycinaldehyd enthält.

Bei obigen Versuchen bin ich von den HHrn. Dr. Walter Axhausen und Dr. Adolf Sonn unterstützt worden. Der erste hat die Tyrosinderivate, der zweite das Glycylaminoacetal bearbeitet. Ich sage beiden Herren für die wertvolle Hülfe besten Dank.

#### 487. Emil Fischer: Über die Carbomethoxyderivate der Phenolcarbonsäuren und ihre Verwendung für Synthesen.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 10. August 1908.)

Bekanntlich sind die Chloride der Phenolcarbonsäuren auf dem gewöhnlichen Wege nicht darstellbar, weil die Chloride des Phosphors nicht allein das Carboxyl, sondern auch die Hydroxyle angreifen und phosphorhaltige Produkte geben. Derselben Schwierigkeit bin ich bei der Synthese von tyrosinhaltigen Polypeptiden begegnet. Ich habe sie aber überwunden durch Anwendung der Carbomethoxyverbindung<sup>1)</sup>. Wie zu erwarten war, läßt sich dieser Kunstgriff auf die Phenolcarbonsäuren übertragen. Bei der Behandlung ihrer kalten, alkalischen Lösung mit Chlorkohlensäuremethylester werden die Phenolgruppen in Carbomethoxygruppen verwandelt, und diese Verbindungen geben in normaler Weise bei der Behandlung mit Phosphorpenntachlorid die entsprechenden Säurechloride. Mit letzteren kann man dann manche der für das Benzoylchlorid bekannten Synthesen ausführen und zum Schluß lassen sich durch Verseifung mit kaltem Alkali die ursprünglichen Phenolgruppen regenerieren.

Ich kann dafür folgende Beispiele anführen:

<sup>1)</sup> Sitzungsbericht der Akademie der Wissenschaften zu Berlin 1908, 542. Vergl. auch die voranstehende Mitteilung.