

Auch auf die genau charakterisirten Derivate der beiden Substanzen erstrecken sich diese Unterschiede, wie man an den Benzoylkörpern sehen kann, wo ebenfalls im Schmelzpunkt, der Löslichkeit und der Krystallform so erhebliche Differenzen sind, dass an eine Identität dieser Verbindungen nicht zu denken ist.

Wir halten bei diesem Sachverhalt die Identität von Koprosterin und  $\alpha$ -Cholestanol für ausgeschlossen, wobei wir natürlich die Voraussetzung machen, dass die Angaben von Bondzynski und Humnicki richtig sind, und möchten nochmals betonen, dass wir das von uns vorgebrachte experimentelle Material für unsere Auffassung als völlig ausreichend betrachten.

Die weitere Bearbeitung<sup>1)</sup> der von uns genau charakterisirten Reductionsproducte von Cholesterin und Cholestenon, sowie ihre eventuelle Verwerthung für die Discussion der Cholesterinfrage behalten wir uns vor.

## 206. Theodor Curtius:

### Einwirkung von salpetriger Säure auf Polyglycinerster.

#### I. Abhandlung.

#### Theodor Curtius und August Darapsky: Ueber Diazoacetyl-amino-essigsäureäthylester.

[Mittheilung aus dem chem. Institut der Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 31. März 1906)

Durch die freiwillige Zusammenlagerung von 4 Mol. Glycinerster zum Triglycylglycinerster,



der sogenannten »Biurethbase«<sup>2)</sup>, entsteht ein Aminosäureester, in welchem alle Bedingungen<sup>3)</sup> vorliegen, um wie Glykocollester in ganz normaler Weise in einen Diazoester überzugehen. Dieselbe Möglich-

<sup>1)</sup> Zur Beschaffung von grösseren Mengen reinen Cholesterins, wie sie für derartige Untersuchungen nöthig sind, wurden uns Mittel aus der Gräfin Bose-Stiftung zur Verfügung gestellt, für deren Verleihung wir der Medicinischen Facultät der hiesigen Universität unseren verbindlichsten Dank aussprechen möchten.

<sup>2)</sup> Th. Curtius, diese Berichte 16, 755 [1883]; 37, 1284 ff. [1904].

<sup>3)</sup> Th. Curtius und E. Müller: Neue Untersuchungen über Diazofettsäureester, diese Berichte 37, 1264 [1904].

keit war durch die Entdeckung des Glycylglycinesters,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ , und des Diglycylglycinesters,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ , durch E. Fischer<sup>1)</sup> geboten: auch diese beiden Ester mussten mit salpetriger Säure beständige Diazoester liefern.

Der Eine von uns<sup>2)</sup> hat im Verein mit O. Gumlich beschrieben, wie dieser Versuch bei dem Tetrapeptid, der sogenannten »Biuretbase«, gelang, und zugleich auf die Wichtigkeit hingewiesen, welche diese Diazoverbindung für den Beweis des Vorhandenseins einer vierfachen Glycinkette besitzt. Bei der Analyse der nicht diazotirten Polyglycinester zeigen sich nämlich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gliedern der Reihe, namentlich im Stickstoffgehalt, welche nicht zu sicheren Schlüssen auf die Länge der Kette berechtigen. Analysirt man dagegen die Diazoester, so kann man einmal durch directe Verbrennung den Gesamtstickstoff, andererseits aber durch Kochen des Diazoesters mit Säuren den Diazostickstoff allein volumetrisch bestimmen. Vergleicht man die beiden gefundenen Mengen Stickstoff, so ergibt sich daraus ein sicherer Schluss auf die Länge der Glycylkette des Polypeptids. Diese Sicherheit wird noch weiter verstärkt, wenn wir die Diazogruppe durch zwei Atome Jod, durch 1 Mol. Salzsäure oder 1 Mol. Wasser ersetzen: die so erhaltenen Dijod-, Monochlor- und Oxy-Acylglycinester müssen dann bei der Analyse das anfänglich bei der Diazoverbindung erhaltene Resultat in sehr charakteristischer Weise bestätigen.

Wir haben die Einwirkung von salpetriger Säure auf den E. Fischerschen Glycylglycinester untersucht und den herrlich krystallisirenden Diazoacetylaminooessigsäureäthylester gewinnen können:  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \longrightarrow \text{N}_2\text{:CHCO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ .

Dieser Diazoacetylaminooessigester zeigt alle Reactionen des Diazoessigesters in Bezug auf die Ersatzfähigkeit der Azogruppe  $\cdot\text{N:N}\cdot$  in der elegantesten Weise und führt in allen Fällen zu schön krystallisirenden Acylglycinestern.

Diazoacetylmino-essigsäureäthylester,  
 $\text{N}_2\text{:CHCO}\cdot\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ .

Versetzt man eine concentrirte, wässrige Lösung von reinem, salzsaurem Glycylglycinester<sup>3)</sup> mit concentrirter Natriumnitritlösung unter Eiskühlung, so tritt auch nach längerem Stehen keine Reaction ein. Auf Zusatz von wenig Eisessig oder verdünnter Schwefelsäure

<sup>1)</sup> E. Fischer, diese Berichte 34, 2872 [1901]; 36, 2984 [1903].

<sup>2)</sup> Th. Curtius, diese Berichte 37, 1295 [1904].

<sup>3)</sup> E. Fischer und E. Fourneau, diese Berichte 34, 2872 [1901].

aber färbt sich die Mischung sofort gelb unter Bildung von Diazoacetylaminooessigsäureäthylester. Letzteren kann man mit Aether oder Chloroform ausschütteln und aus der ätherischen Lösung durch Verdunsten im Vacuum, aus der Chloroformlösung durch Fällen mit Ligroin in festem Zustand gewinnen. Am einfachsten und besten ist folgendes Verfahren:

9.8 g ( $\frac{1}{20}$  Mol.) salzsaurer Glycylglycinester werden in 40 ccm Natriumacetatlösung (2 Mol. im Liter) gelöst und unter guter Eiskühlung zunächst mit einer Lösung von 5 g Natriumnitrit in der doppelten Menge Wasser vermischt und darauf 2 ccm Eisessig hinzugefügt. Man lässt die sich sofort gelb färbende Mischung rubig, ohne umzuschütteln, 5 Stdn. in Eiswasser stehen. Die Flüssigkeit erstarrt dabei zu einem voluminösen Brei gelber Krystalle. Dieser wird abgesaugt, mit kleinen Mengen Eiswasser, verdünnter Sodalösung und schliesslich wieder mit Eiswasser gut ausgewaschen und im Vacuum-exsiccator getrocknet. Ausbeute: 4.5–4.9 g, entsprechend 52–57 pCt.

Diazoacetylaminooessigsäureäthylester ist in kaltem Wasser mässig, in warmem dagegen sehr leicht löslich; bei längerem Erhitzen erfolgt Zersetzung unter Gasentwicklung und Entfärbung. In Benzol ist die Substanz in der Kälte schwer, in der Hitze leicht löslich, noch leichter in warmem Alkohol und spielend bereits in der Kälte in Chloroform, in Ligroin dagegen auch in der Wärme äusserst schwer löslich. Aether löst ziemlich schwer.

Durch Umkrystallisiren aus der 3-fachen Menge siedenden Alkohols erhält man schöne, glänzende Blätter von gelber Farbe. Schmp. 107°.

0.2640 g Sbst.: 0.4096 g CO<sub>2</sub>, 0.1319 g H<sub>2</sub>O. — 0.2689 g Sbst.: 0.4133 g CO<sub>2</sub>, 0.1262 g H<sub>2</sub>O. — 0.2261 g Sbst.: 48.7 ccm N (19°, 746 mm) (nach Dumas). — 0.2447 g Sbst.: 52.8 ccm N (18°, 748 mm) (nach Dumas).

C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>. Ber. C 42.11, H 5.26, N 24.56.

Gef. » 42.31, 41.93, » 5.55, 5.22, » 24.29, 24.52.

Bestimmung des Diazostickstoffs durch Zersetzung mit verdünnter Schwefelsäure:

0.1833 g Sbst.: 26.5 ccm N (22°, 743 mm). — 0.1805 g Sbst.: 26.0 ccm N (21°, 746 mm). — 0.1642 g Sbst.: 24.0 ccm N (21°, 736 mm).

C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>. Ber. N 16.37. Gef. N 16.00, 16.08, 16.18.

#### Reduction von Diazoacetyl-glycinäthylester.

Eine Lösung von 20 g Eisenvitriol in 50 ccm Wasser wurde mit 20 g Natronlauge (33 pCt.) versetzt und die alkalisch reagirende Mischung mit einer Lösung von 1.7 g Diazoacetyl-glycinester in 50 ccm Wasser während einer Viertelstunde bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der Eisenniederschlag wurde sodann abfiltrirt und zweimal mit warmem Wasser ausgewaschen, das Filtrat mit verdünnter Schwefel-

säure angesäuert und das gebildete Hydrazin mit Benzaldehyd in Form von Benzaldazin der sauren Lösung entzogen. Erhalten wurden so 0.9 g Benzaldazin, entsprechend einer Ausbeute von 43 pCt.

Das Filtrat vom Benzaldazin wurde zur Entfernung überschüssigen Benzaldehyds ausgeäthert, mit Natriumacetat und essigsauerm Phenylhydrazin versetzt und gelinde erwärmt. Hierbei fiel aber kein Hydrazon aus, wie man hätte erwarten dürfen, da bei der Reduction von Diazoessigester nach dem analogen Verfahren<sup>1)</sup> bekanntlich Glyoxylsäure sich neben Hydrazin bildet.

Dijodacetyl-amino-essigsäureäthylester,  
 $J_2CHCO.NHCH_2CO_2C_2H_5$ .

1.7 g ( $\frac{1}{100}$  Mol.) Diazoacetyl-glycinester wurden mit 100 ccm absolutem Aether übergossen und allmählich 2.5 g Jod eingetragen. Dieses wird anfangs rasch verbraucht unter lebhafter Stickstoffentwicklung. Die durch überschüssiges Jod braunroth gefärbte ätherische Lösung wurde an der Luft verdunsten gelassen, der krystallinische Rückstand bis zur Entfärbung mit kaltem Alkohol gewaschen und dann aus wenig warmem Alkohol (15 ccm) umkrystallisirt. Die so erhaltenen, farblosen, körnigen, zu Drusen vereinigten Krystalle schmolzen bei 127—128° zu einer braunrothen Flüssigkeit. Ausbeute: 2.6 g, entsprechend 65 pCt.

0.3270 g Sbst.: 10.8 ccm N (20°, 744 mm). — 0.2737 g Sbst.: 0.3250 g AgJ (nach Kekulé mit Natriumamalgam).

$C_6H_9O_3N_2$ . Ber. N 3.53, J 63.98.

Gef. » 3.70, » 64.17.

Dijodacetyl-aminoessigsäureäthylester ist schwer löslich in Wasser, Aether und Ligroin, leicht löslich in warmem Alkohol, Benzol und Chloroform.

Oxyacetyl-glycinäthylester,  $CH_2(OH)CO.NHCH_2CO_2C_2H_5$ .

1.7 g Diazoacetyl-glycinester wurden mit 10 ccm Wasser etwa eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, bis die Stickstoffentwicklung beendet war. Die anfangs gelbe Lösung färbte sich dabei röthlich und nahm einen eigenthümlichen, zwiebelartigen Geruch an. Beim Verdunsten im Vacuum über Schwefelsäure hinterblieb ein dicker Syrup, der nach mehrtägigem Stehen zu einer bräunlich gefärbten Krystallmasse erstarrte. Zur Analyse wurde die Substanz zweimal aus wenig warmem Benzol umkrystallisirt und so in derben, farblosen Prismen gewonnen, die bei 68.5° schmolzen.

<sup>1)</sup> R. Jay und Th. Curtius, diese Berichte 27, 775 [1894].

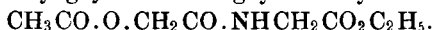
0.2635 g Sbst.: 0.4312 g CO<sub>2</sub>, 0.1590 g H<sub>2</sub>O. — 0.2312 g Sbst.: 18.7 ccm N (18°, 739 mm).

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N. Ber. C 44.72, H 6.83, N 8.70.

Gef. » 44.63, » 6.71, » 9.08.

Oxyacetyl-glycinäthylester ist spielend löslich in Wasser, Alkohol und Chloroform bereits in der Kälte; von warmem Benzol wird die Verbindung sehr leicht aufgenommen und scheidet sich daraus beim Abkühlen zunächst als Oel ab. In Aether und Ligroin ist die Substanz äusserst schwer löslich.

#### Acetyl-glykolsäure-glycinäthylester,



17 g Diazoacetyl-glycinester wurden unter Kühlung mit Eis mit 0.8 g Eisessig übergossen, wobei die Substanz unter lebhafter Stickstoffentwicklung in Lösung ging. Die beim Verdampfen im Vacuum hinterbleibende, bräunliche, strahlig-krystallinische Masse wurde mit kaltem Aether gewaschen und dann in wenig warmem Benzol gelöst. Beim Abkühlen schieden sich farblose, silberglänzende Blättchen ab. Die Substanz wird von Wasser, Alkohol und Chloroform spielend aufgenommen, in Aether und kaltem Benzol ist sie mässig, in Ligroin auch in der Hitze schwer löslich. Schmp. 88—89°.

0.2525 g Sbst.: 0.4377 g CO<sub>2</sub>, 0.1420 g H<sub>2</sub>O. — 0.1963 g Sbst.: 12.6 ccm N (20°, 739 mm).

C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N. Ber. C 47.29, H 6.40, N 6.90.

Gef. » 47.28, » 6.25, » 7.14.

#### Benzoyl-glykolsäure-glycinäthylester,



Eine Lösung von 1.7 g Diazoacetyl-glycinester in 20 ccm Benzol wurde mit 1.2 g Benzoesäure versetzt und auf dem Wasserbade am Rückflusskühler bis zum Aufhören der Gasentwicklung gekocht. Beim Abdestilliren des Benzols hinterblieb ein dicker, brauner Syrup, der beim Abkühlen zu einer grauweissen, krystallinischen Masse erstarrte. Diese wurde zur Entfernung überschüssiger Benzoesäure mit verdünnter Sodalösung verrieben, abgesaugt, mit Wasser gut ausgewaschen und der Rückstand aus der 150-fachen Menge siedenden Wassers umkrystallisirt. Die so erhaltenen, feinen, äusserst leichten Nadeln schmolzen bei 94.5°; ihre Menge betrug 1.8 g, entsprechend einer Ausbeute von 68 pCt.

0.2903 g Sbst.: 0.6240 g CO<sub>2</sub>, 0.1486 g H<sub>2</sub>O. — 0.2632 g Sbst.: 13 ccm N (19°, 748 mm).

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>N. Ber. C 58.87, H 5.66, N 5.28.

Gef. » 58.62, » 5.69, » 5.58.

Benzoylglykolsäureglycinäthylester ist spielend löslich in Chloroform, leicht in Alkohol, schwerer in Aether und Benzol. Wasser und Ligroin nehmen die Verbindung in der Wärme schwer, in der Kälte fast garnicht auf.

Hippurylglykolsäure-glycinäthylester,  
 $C_6H_5CO.NHCH_2CO.O.CH_2CO.NHCH_2CO_2C_2H_5$ .

Wurde in gleicher Weise, wie der eben beschriebene Benzoylglykolsäureglycinester, durch Kochen von Diazoacetylglycinester und Hippursäure in Benzollösung gewonnen. Auch hier hinterblieb beim Abdestilliren des Benzols ein im Vacuum allmählich krystallinisch erstarrender Syrup. Zur Reinigung wurde das Rohproduct zunächst mit verdünnter Sodalösung gewaschen und darauf aus Wasser, in welchem die Substanz auch in der Wärme schwer löslich ist, umkrystallisirt. Haarfeine, seidenglänzende Nadeln vom Schmp.  $88^{\circ}$ . Spielend löslich in Chloroform, leicht löslich in Alkohol und Benzol, schwer löslich in Aether und Ligroin; von siedendem Wasser sind etwa 10 Theile zur Lösung erforderlich.

0.1304 g Sbst.: 9.8 ccm N ( $17^{\circ}$ , 754 mm).

$C_{15}H_{18}O_6N_2$ . Ber. N 8.70. Gef. N 8.65.

Chloracetyl-glycinäthylester,  $CH_2ClCO.NHCH_2CO_2C_2H_5$ .

In eine Suspension von 1.7 g Diazoacetylglycinester in 100 ccm absolutem Aether wurde trocknes Salzsäuregas eingeleitet. Die Flüssigkeit wurde dabei entfärbt, der Diazoester ging allmählich unter Stickstoffentwicklung in Lösung, dann schieden sich geringe Mengen einer weissen, krystallinischen Substanz ab. Die ätherische, salzsaure Lösung hinterliess beim Verdunsten im Vacuum harte, zu Warzen vereinigte Krystalle der gleichen Verbindung. Zur Analyse wurde das Rohproduct aus siedendem Ligroin (300 ccm) umkrystallisirt und so in Form leichter, feiner, stark glänzender, farbloser Nadeln gewonnen, die bei  $62-63^{\circ}$  schmolzen.

0.2132 g Sbst.: 15 ccm N ( $20^{\circ}$ , 758 mm). — 0.1421 g Sbst.: 0.1129 g AgCl (nach Kekulé mit Natriumamalgam).

$C_6H_{10}O_3NCl$ . Ber. N 7.80, Cl 19.78.

Gef. » 8.03, » 19.66.

Die Verbindung ist identisch mit dem inzwischen auf anderem Wege von O. Diels und H. Heintzel<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Chloressigester auf Glykocoll ester unter Alkoholabspaltung gewonnenen Chloracetyl-glycinäthylester.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 38, 304 [1905].