

226. Max Bergmann und Leonidas Zervas: Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung in Dresden.]

(Eingegangen am 18. Juni 1932.)

Die Eigenschaften der Proteine variieren mit der Art und der Reihenfolge der miteinander verknüpften Amino-säuren. Das Studium des gegenseitigen Einflusses der Amino-säure-Reste innerhalb der Peptid-Kette war bisher gehemmt durch die Unvollkommenheit unserer Verfahren zur Synthese von Peptiden. Von den klassischen Peptid-Synthesen Emil Fischers hat jene noch den weitesten Anwendungsbereich, die sich der Halogen-acyl-halogenide bedient¹⁾. Aber auch sie ist beschränkt auf die wenigen Amino-säuren, die aus Halogen-acylhalogeniden erhältlich sind. Wir suchten deshalb nach einem vielseitigeren Verfahren, das uns schon aus dem Grunde erwünscht war, weil die moderne Ferment-Chemie für ihre Untersuchungen über Wirkungsmechanismus und Spezifität der Peptidasen möglichst viele verschiedenartige Peptid-Kombinationen zur Verfügung haben muß.

Alle neueren Versuche zur Peptid-Synthese arbeiten nach folgendem Schema: Die Aminogruppe der ersten Amino-säure wird zuerst durch Einführung einer schützenden Atomgruppe R stabilisiert, dann wird das Carboxyl der Amino-säure so verändert, daß es zur Kuppelung mit einer zweiten Amino-säure befähigt wird, die Kuppelung wird vollzogen und schließlich die Atomgruppe R wieder abgespalten; damit liegt das fertige Peptid vor. Die Schwierigkeit liegt nun darin, eine geeignete Atomgruppe R zu finden, die sich am Schluß der Synthese so leicht wieder abspalten läßt, daß die Peptid-Bindung dabei nicht in erheblichem Maße angegriffen wird. Als Schutzgruppe R hat man Acetyl²⁾ oder Toluolsulfonyl³⁾ vorgeschlagen; aber ihre Anwendung hat bei der Peptid-Synthese nur zu vereinzelten Erfolgen geführt.

Viel allgemeinerer Anwendung fähig ist, wie wir im folgenden zeigen, der Rest $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot O \cdot CO$ der Benzylester-kohlensäure, kurz Carbo-benzoxo-Rest (Cbzo) genannt; denn er läßt sich mit Hilfe des leicht zugänglichen Chlorids $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot Cl$ unschwer in Amino-säuren der verschiedensten Art einführen (Glykokoll-, *d*- und *d*, *l*-Alanin, *l*-Asparaginsäure, *l*-Asparagin, *d*-Glutaminsäure, *d*-Glutamin, *d*, *l*-Serin, *l*-Cystin, *d*, *l*-Phenyl-alanin, *l*-Tyrosin, *d*-Arginin, *l*-Histidin, ferner Glycyl-glycin) und — was das Wesentliche ist — durch einfache katalytische Hydrierung⁴⁾ im offenen Gefäß in Form von Toluol und Kohlendioxyd wieder abspalten. Intermediär werden wohl Carbaminsäuren auftreten: $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot NH \cdot CH(R) \cdot COOH \rightarrow C_6H_5 \cdot CH_3 + HOCO \cdot NH \cdot CH(R) \cdot COOH \rightarrow CO_2 + NH_2 \cdot CH(R) \cdot COOH$. In ganz der gleichen Weise läßt sich der Rest der Benzylester-kohlensäure als Substituent der Aminogruppe aus Peptiden ent-

¹⁾ An Stelle der Halogen-fettsäuren hat K. Freudenberg kürzlich die Azido-fettsäuren angewandt; vergl. Sitz.-Ber. Heidelberg. Akad. Wiss. 1931, 9. Abhandl.

²⁾ M. Bergmann, F. Stern u. Ch. Witte, A. 449, 277 [1926]; M. Bergmann u. H. Köster, Ztschr. physiol. Chem. 167, 91 [1927]; M. Bergmann u. L. Zervas, Ztschr. physiol. Chem. 175, 154 [1928]; M. Bergmann, L. Zervas u. V. du Vigneaud, B. 62, 1905 [1929]. ³⁾ R. Schönheimer, Ztschr. physiol. Chem. 154, 203 [1926].

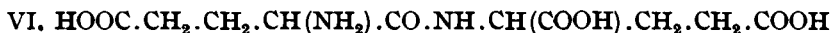
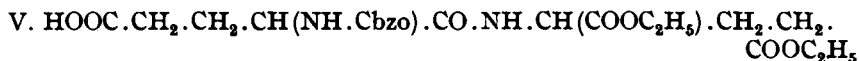
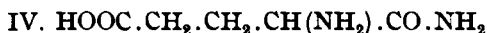
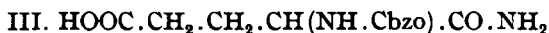
⁴⁾ Zur katalytischen Hydrierung von *O*- und *N*-gebundenen Benzylgruppen vergl. K. W. Rosenmund u. F. Zetzsche, B. 54, 2038 [1921]; E. Merck, Dtsch. Reichs-Pat. 407487, 417926; K. Freudenberg, W. Dürr u. H. v. Hochstetter, B. 61, 1735 [1928]; H. O. L. Fischer u. E. Baer, B. 65, 337, 345 [1932].

fernen. Dieses Verhalten hat uns die Synthese verschiedener Peptide ermöglicht, die bisher nicht zugänglich waren:

1. Die beiden Amino-dicarbonsäuren *d*-Glutaminsäure und *l*-Asparaginsäure lassen sich nach unserem Verfahren mit ihrem α -Carboxyl in Peptid-Bindung bringen, und zwar ohne ihre optische Aktivität einzubüßen. Als Beispiel für den neuen Dipeptid-Typus beschreiben wir *d*-Glutaminy-*d*-glutaminsäure und *l*-Asparagyl-*l*-tyrosin, sowie in Verbindung damit die Synthesen von *d*-Iso-glutamin und *l*-Iso-asparagin.

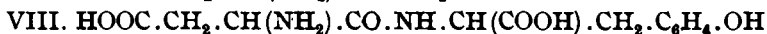
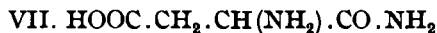
Carbobenzoxy-*d*-glutaminsäure (I) geht beim Erwärmen mit Acetanhydrid in ein optisch aktives Anhydrid (II) über, das mit Leichtigkeit Ammoniak anlagert (III) und bei der Hydrierung *d*-Iso-glutamin (IV) liefert. III und IV sind verschieden vom natürlichen *d*-Glutamin und seiner Verbindung mit Benzylester-kohlensäure, deren γ -Carboxyl amidiert ist. Diese Verschiedenheit beweist, daß in unserem Fall das Anhydrid II die Kuppelung mit Ammoniak am α -Carboxyl vollzogen hat.

In Analogie dazu geben wir der von uns bereiteten Verbindung des Anhydrids II mit *d*-Glutaminsäure-diäthylester die Formel V. Sie liefert bei der hydrolytischen Ablösung der Äthyle und nach Hydrierung die *d*-Glutaminy-*d*-glutaminsäure VI. Dieses Dipeptid ist nach seinem Schmp. 205° ganz verschieden von seinem Präparat gleichen Namens, das A. Blanchetiere⁵⁾ aus Glutaminsäure durch thermische Kondensation und nachfolgende Alkali-Hydrolyse des intermediär gebildeten Anhydrids erhielt (Schmp. 167—168°).



Von Pankreatin wird unsere Glutaminy-glutaminsäure nach vorläufigen Versuchen von Hrn. Dr. H. Schleich schnell gespalten. Die Häufung der Carboxyle um die Peptid-Bindung verhindert also nicht die enzymatische Spaltbarkeit.

Die Synthese des *l*-Iso-asparagins (VII) und des *l*-Asparagyl-*l*-tyrosins (VIII) wurde, ausgehend von der Carbobenzoxy-*l*-asparaginsäure, mit ganz analogen Zwischenstufen durchgeführt, wie eben bei Glutaminsäure beschrieben. Die Asparaginsäure hat bei diesen Synthesen ebenfalls mit dem α -Carboxyl gekuppelt.



l-Asparagyl-*l*-tyrosin wird nach Versuchen des Hrn. Dr. H. Schleich weder von käuflichem Pankreatin noch von frisch bereitetem Auszug der

⁵⁾ Bull. Soc. Chim. France [4] 31, 1045 [1922], 35, 1317 [1924].

Schweinedarm-Schleimhaut gespalten. Auf dieses merkwürdige Verhalten müssen wir baldmöglichst eingehender zurückkommen. Es gilt zu entscheiden, ob die Synthese in diesem Falle, entgegen unserer Annahme, zu einem β -Peptid geführt hat oder ob für α -Asparagyl-peptide besondere Ferment-Spezifitäten vorliegen.

2. Die Synthese von Glucopeptiden des *d*-Glucosamins beschreiben wir in der auf S. 1201 folgenden Abhandlung.

3. Die Synthese des Glycyl-*l*-prolins vom Schmp. 185° und $[\alpha]_D^{20} = -112.6^\circ$ (in Wasser), die Herr Dipl.-Ing. F. Leinert durchgeführt hat, beschreiben wir an anderer Stelle zusammen mit dem fermentativen Verhalten des Peptids.

4. Dasselbe gilt für die von Hrn. Dr. J. P. Greenstein durchgeführte Synthese der *d*-Lysyl-*d*-glutaminsäure vom Schmp. 197° und $[\alpha]_D^{20} = +22.9^\circ$ (in Wasser).

Emil Fischer hat seine ersten Versuche zur Synthese von Peptiden mit Hilfe der Äthylester-kohlensäure begonnen. Er hat aber dieses Verfahren ohne positive Ergebnisse wieder verlassen, weil er bei der alkalischen Aufspaltung der Carbäthoxygruppe unverseifbare *N*-Carbonsäuren zu erhalten glaubte⁶⁾. F. Wessely und E. Komm⁷⁾ haben nachgewiesen, daß es sich hierbei um sekundäre Umlagerungsprodukte handelt. Diese Störungen fallen bei Anwendung der Benzylester-kohlensäure wegen der Möglichkeit hydrierender Spaltung fort.

Wie wir früher festgestellt haben⁸⁾, werden die Acetyl- und Benzoyl-Derivate optisch aktiver Amino-säuren durch Acetanhydrid mit größter Leichtigkeit katalytisch racemisiert. Wir konnten zeigen, daß es sich um eine Desmotropie des Wasserstoffs am asymmetrischen α -Kohlenstoffatom handelt. Auch bei der Umwandlung acylierter Amino-säuren in ihre Säurechloride⁹⁾ erfolgt Racemisation. Bemerkenswerterweise bewahren die Carbobenzoxy-Derivate der Amino-säuren sowohl bei Behandlung mit Acetanhydrid wie bei Überführung in die Säurechloride ihre optische volle Aktivität¹⁰⁾. Wir gelangen also mit unserer neuen Peptid-Synthese von optisch aktiven Amino-säuren zu aktiven Peptiden.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ganz ergebenst für die Gewährung von Mitteln zu dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

Benzylester-kohlensäure-chlorid.

Zu 240 g einer eisgekühlten, 20-proz. Phosgen-Lösung in Toluol gibt man auf einmal 45 ccm reinen Benzylalkohol. Nach $\frac{1}{2}$ -stdg. Stehen in

⁶⁾ E. Fischer, B. **35**, 1095 [1902], **36**, 2094, 2106 [1903]; L. Havestadt u. R. Fricke, B. **57**, 2048 [1924], haben nach diesem Verfahren ämorphe „Tyrosyl-asparaginsäure“ dargestellt, deren Natur und Einheitlichkeit durchaus fraglich ist.

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **174**, 306 [1928]. ⁸⁾ Biochem. Ztschr. **203**, 280 [1928].

⁹⁾ E. Fischer, B. **41**, 2860 [1908]; E. Fischer, W. Kropp u. A. Stahlschmidt, A. **365**, 181 [1909]; P. Karrer u. M. dalla Vedova, Helv. chim. Acta **11**, 368 [1928].

¹⁰⁾ Dieses Ausbleiben der Racemisierung bei carbobenzoylierten Aminosäuren wird verständlich auf Grund der Vorstellungen, die wir früher für die Racemisierung acylierter Amino-säuren entwickelt haben (Biochem. Ztschr. **203**, 280 [1928]). Wir kommen auf diese Frage bei anderer Gelegenheit zurück.

Eis und 2-stdg. Stehen bei Zimmer-Temperatur entfernt man den Überschuß des Phosgens durch einen Strom von trockenem Stickstoff oder Kohlendioxyd, und hiernach unter vermindertem Druck bei nicht mehr als 60° Badtemperatur das Toluol. Es hinterbleiben etwa 60 g Säurechlorid, das für die folgenden Synthesen genügend rein ist. Beim Versuch, es durch Destillation zu reinigen, erfolgt erhebliche Zersetzung zu Benzylchlorid und Kohlendioxyd.

N-Carbobenzoxo-glykokoll.

Die Lösung von 7.5 g Glykokoll in 25 ccm 4-n. Natronlauge versetzten wir während 20 Min. unter Eiskühlung und dauerndem Schütteln abwechselnd mit im ganzen 17 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und 25 ccm 4-n. Natronlauge in je 5 Portionen. Beim Ansäuern mit starker Salzsäure krystallisierten bald lange Prismen. Umlösen aus Chloroform. Schmp. 120° (korr.). Ausbeute 15 g = 72% d. Th. Leicht löslich in Alkohol, schwer löslich in kaltem Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln.

$C_{10}H_{11}O_4N$ (209.1). Ber. C 57.39, H 5.30, N 6.70. Gef. C 57.45, H 5.49, N 6.69.

Säurechlorid: Als 6.3 g Carbobenzoxo-glykokoll mit 35 ccm wasser-freiem Äther und 6.7 g pulverisiertem Phosphorpentachlorid etwa 20 Min. unter Eiskühlung geschüttelt wurden, war fast alles gelöst. Die filtrierte Flüssigkeit wurde unter geringem Druck und Wasser-Ausschluß bei etwa 10° möglichst vollständig verdampft, der Rückstand 2-mal mit getrocknetem Petroläther durchgeschüttelt und mit einer dritten Portion Petroläther bei -10° bis zur Krystallisation aufbewahrt. 5.3 g. Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther. Das Chlorid schmolz dann bei 43° unt. Zers. in N-Carbonsäure-glykokoll-anhydrid und Benzylchlorid: $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot Cl = CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O + C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot Cl$. Die-

selbe Umwandlung tritt langsam beim Aufbewahren des Chlorids im Exsiccator über P_2O_5 ein.

N-Carbobenzoxo-d, l-alanin.

Darstellung aus d, l-Alanin und Ausbeute ähnlich wie beim Glykokoll geschildert. Reinigung durch Ausfällen aus Aceton-Lösung mit Wasser. Langgestreckte Blätter vom Schmp. 114–115° (korr.). Schwer löslich in Wasser, leicht in den meisten organischen Mitteln.

$C_{11}H_{13}O_4N$ (223.1). Ber. C 59.16, H 5.87, N 6.28. Gef. C 59.23, H 5.91, N 6.38.

N-Carbobenzoxo-d-alanin.

Die zuerst ölig erhaltene Verbindung krystallisierte nach wenigen Stdn. Umlösen aus Äther-Petroläther ergab Nadeln vom Schmp. 84°. Ausbeute und Löslichkeiten ähnlich der d, l-Verbindung.

Gef. C 59.00, H 5.96, N 6.21.

$[\alpha]_D^{17} = -1.29^\circ \times 4.4110 / 1 \times 1.085 \times 0.3671 = -14.3^\circ$ (in Eisessig).

Das Säurechlorid haben wir ähnlich wie beim Carbobenzoxoglykokoll beschrieben, erhalten, jedoch vorerst nur als Öl. Trotzdem läßt es sich, frisch dargestellt, gut zu Synthesen verwenden (vergl. die auf S. 1201 folgende Abhandlung). Beim Zersetzen des Chlorids mit verd. Natronlauge und nachträglichem Ansäuern wurde Carbobenzoxo-d-alanin (Schmp. 84° $[\alpha]_D^{18} = -14.2^\circ$) zurückgehalten.

N-Carbobenzoxo-*d*, *l*-serin.

Aus 10.5 g *d*, *l*-Serin in 50 ccm 2-*n*. Natronlauge mit 17 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und weiteren 50 ccm 2-*n*. Lauge. Umkrystallisation aus Essigester: 10 g = 42% d. Th. Schmp. 125° (korr.). Lange, sechseckige Blätter, leicht löslich in Alkohol, schwer in Wasser und vielen organischen Mitteln.

$C_{11}H_{13}O_3N$ (239.1). Ber. C 55.21, H 5.48, N 5.86. Gef. C 55.18, H 5.65, N 5.68.

N, *N*-Di-carbobenzoxo-*l*-cystin.

Aus 7.2 g *l*-Cystin in 60 ccm *n*-Natronlauge mit 15.3 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und 120 ccm *n*-Natronlauge. Nach dem Ansäuern wurde mit Essigester ausgeschüttelt, dieser gewaschen, verdampft und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Bald schieden sich lange Nadeln vom Schmp. 123° (korr.) ab. Leicht löslich in Alkohol und Essigester, schwer in Wasser und den meisten organischen Mitteln.

$C_{22}H_{24}O_8N_2S_2$ (508.3).

Ber. C 51.94, H 4.76, N 5.51, S 12.62. Gef. C 52.13, H 4.91, N 5.58, S 12.48.

$[\alpha]_D^{20} = -6.66^\circ \times 4.4778/1 \times 1.076 \times 0.3023 = -91.7^\circ$ (in Eisessig).

Mit Phosphorpentachlorid erhält man das Säurechlorid in schönen Nadeln vom Schmp. 67–68°. Seine Kuppelung mit Glykokoll-äthylester ergab unschwer den gut krystallisierenden Di-carbobenzoxo-*l*-cystyl-di-glycin-äthylester vom Schmp. 166° (korr.) (Ber. C 53.06, H 5.65, N 8.26. Gef. C 53.03, H 5.85, N 8.10). Zum gleichen Produkt kommt man vom *l*-Cystin-methylester durch Carbobenzoxylierung über das Hydrazid und Azid durch Umsetzung des letzteren mit Glycin-äthylester.

N-Carbobenzoxo-*d*-glutaminsäure (I).

8.8 g *d*-Glutaminsäure und 7.4 g Magnesiumoxyd wurden in 100 ccm Wasser, das mit 30 ccm Äther überschichtet war, eingetragen und die Mischung unter Eiskühlung und dauerndem Schütteln portionsweise im Laufe von 1/2 Stde. mit 20.4 g Benzylester-kohlensäure-chlorid versetzt und anschließend bei gewöhnlicher Temperatur bis zur fast vollständigen Lösung geschüttelt. Nach dem Ansäuern mit starker Salzsäure wurde die Reaktionsmischung mehrmals mit Essigester extrahiert, die Auszüge wurden oft mit Salzsäure gewaschen, über ein trocknes Filter filtriert und im Vakuum vollständig zur Trockne verdampft. Durch Aufnehmen in wenig Essigester und vorsichtiges Füllen mit Petroläther erhielten wir etwa 15 g Carbobenzoxo-*d*-glutaminsäure in Form kleiner Nadeln vom Schmp. 120°.

$C_{13}H_{15}O_6N$ (281.1). Ber. C 55.49, H 5.38, N 4.98. Gef. C 55.61, H 5.54, N 5.17.

$[\alpha]_D^{19} = -0.61^\circ \times 3.4778/1 \times 1.067 \times 0.2816 = -7.1^\circ$ (in Eisessig).

Die Substanz ist schwer löslich in Wasser, Chloroform, Äther, leicht löslich in Alkohol und Essigester.

Anhydrid (II): 14 g Carbobenzoxo-*d*-glutaminsäure wurden mit 40 ccm Essigsäure-anhydrid 5 Min. auf 100° erwärmt, die Lösung im Vakuum vollständig verdampft und der Rückstand in etwa 20 ccm trockenem Chloroform aufgenommen. Bei starkem Abkühlen schieden sich 11 g Anhydrid ab. Es bilden lange Prismen, ist in den meisten organischen Lösungs-

mitteln in der Kälte mäßig löslich. Am besten läßt sie sich aus Benzol umkrystallisieren. Schmp. 94°.

$C_{13}H_{13}O_5N$ (263.1). Ber. C 59.29, H 4.98, N 5.32. Gef. C 59.23, H 5.05, N 5.39.

$[\alpha]_D^{20} = -2.63^\circ \times 3.7531/1 \times 1.075 \times 0.2084 = -44.1^\circ$ (in Eisessig).

Das Anhydrid läßt sich ohne Veränderung aus Alkohol umkrystallisieren, wenn die Lösung nicht lange erhitzt wird. Beim Behandeln mit wasserhaltigem Aceton in der Wärme geht es bald quantitativ in die ursprüngliche Säure vom Schmp. 120° und $[\alpha]_D^{19} = -7.0^\circ$ über.

Synthese des *d*-Iso-glutamins.

N-Carbobenzoxy-*d*-isoglutamin (III): Die Lösung von 6 g des soeben beschriebenen Anhydrids in wasser-freiem Chloroform wurde mit einer eisgekühlten ätherischen Ammoniak-Lösung versetzt und der abgeschiedene Niederschlag nach kurzer Zeit abgesaugt. Seine wäßrige Lösung gab mit verd. Salzsäure ein bald krystallisierendes Öl. Prismen, 5.3 g. Bei 1-maliger Krystallisation aus Wasser oder Methanol stieg der Schmp. auf 175° (korr.), aber die Ausbeute ging gleichzeitig stark zurück.

$C_{13}H_{16}O_5N_2$ (280.1). Ber. C 55.68, H 5.76, N 10.00. Gef. C 55.85, H 5.87, N 9.87.

Das Drehungsvermögen der Substanz ist so gering, daß es hart an der Fehlergrenze der üblichen Bestimmungsmethode liegt. Leicht löslich in heißem Wasser und heißem Alkohol, schwer löslich in den meisten anderen organischen Mitteln.

Zum Vergleich haben wir aus einer kleinen Probe *d*-Glutamin — einem Originalpräparat von H. Thierfelder, das wir der Freundlichkeit von Hrn. Prof. F. Knoop, Tübingen, verdanken — in Gegenwart von Natriumbicarbonat das *N*-Carbobenzoxy-*d*-glutamin bereitet. Nadeln vom Schmp. 137° (korr.). Leicht löslich in Alkohol, schwer in den meisten anderen organischen Lösungsmitteln.

d-Iso-glutamin (IV): 1.4 g Carbobenzoxy-*d*-iso-glutamin wurden in wäßrigem Methanol, das etwas Essigsäure enthielt, im offenen Gefäß in Gegenwart von Palladiummohr mit Wasserstoff behandelt. Nach etwa $\frac{1}{4}$ Stde. hörte die Kohlendioxyd-Bildung auf. Beim Eindampfen unter vermindertem Druck hinterblieben Krystalle, die in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol wieder abgeschieden wurden. Ausbeute fast quantitativ.

$C_8H_{10}O_3N_2$ (146.1). Ber. C 41.07, H 6.90, N 19.18. Gef. C 41.12, H 6.97, N 19.12.

$[\alpha]_D^{20} = +1.38^\circ \times 3.5439/1 \times 1.015 \times 0.2288 = +21.1^\circ$ (in Wasser), natürliches *d*-Glutamin (s. o.) zeigt unter denselben Bedingungen $[\alpha]_D^{20} = +6.0^\circ$.

d-Iso-glutamin ist in Wasser leicht löslich, in allen von uns untersuchten organischen Mitteln dagegen schwer.

N-Carbobenzoxy-*l*-asparaginsäure.

Aus 8 g *l*-Asparaginsäure wurden 11 g Carbobenzoxy-Derivat in Form vierseitiger Tafeln vom Schmp. 116° erhalten. Darstellung und Löslichkeiten ähnlich dem Derivat der *d*-Glutaminsäure.

$C_{12}H_{13}O_4N$ (267.1). Ber. C 53.91, H 4.91, N 5.25. Gef. C 54.00, H 5.04, N 5.40.

$[\alpha]_D^{18} = +0.74^\circ \times 1.8010/1 \times 1.089 \times 0.1278 = +9.6^\circ$ (in Eisessig).

Anhydrid: 5.4 g Carbobenzoxyl-asparaginsäure wurden mit 16 ccm Acetanhydrid rasch aufgeköcht, sofort abgekühlt und die Lösung mit wasser-freiem Äther und Petroläther versetzt. Sofortige Krystallisation. Nach Waschen mit etwas Äther behielten wir 4.1 g Anhydrid vom Schmp. 84°.

$C_{12}H_{11}O_5N$ (249.1). Ber. C 57.81, H 4.45, N 5.62. Gef. C 57.97, H 4.43, N 5.43.

$[\alpha]_D^{19} = -1.78^\circ \times 4.3261/1 \times 1.079 \times 0.1793 = -39.8^\circ$ (in Eisessig).

Das Anhydrid löst sich in den meisten organischen Mitteln in der Kälte schwer. Mit wasser-haltigem Aceton liefert es beim Erwärmen Carbobenzoxyl-asparaginsäure vom Schmp. 116° und $[\alpha]_D^{18} = +9.5^\circ$ zurück.

Synthese des *l*-Iso-asparagins (VII).

N-Carbobenzoxyl-*l*-iso-asparagin: 2.7 g Carbobenzoxyl-*l*-asparaginsäure-anhydrid (s. oben) wurden in 20 ccm eisgekühltem, wäßrigem Ammoniak (von etwa 25% Gehalt) unter Schütteln gelöst. Beim Ansäuern schieden sich kurze Stäbchen vom Schmp. 164° (korr.) ab. Ausbeute 2 g.

$C_{13}H_{14}O_5N_2$ (266.1). Ber. C 54.11, H 5.30, N 10.53. Gef. C 54.17, H 5.44, N 10.50.

$[\alpha]_D^{18} = +0.23^\circ \times 4.5882/2 \times 1.066 \times 0.0713 = +6.9^\circ$ (in Eisessig).

Die Substanz ist nur in heißem Wasser und heißem Methanol leicht löslich. Der mittels Diazo-methans bereitete Methylester zeigt Schmp. 121° (korr.) und $[\alpha]_D^{20} = +9.0^\circ$ (in Eisessig). (CH_3O . Ber. 11.08. Gef. 11.10.)

l-Iso-asparagin: Aus der voranstehenden Verbindung durch katalytische Hydrierung, wie bei der Darstellung des *d*-Iso-glutamins geschildert wurde. Ausbeute fast quantitativ. Das *l*-Iso-asparagin bildet lange Nadeln. Es krystallisiert mit 1 Mol. Wasser, das im Hochvakuum bei 78° nicht entweicht. Mit Natronlauge gibt es in der Kälte kein Ammoniak ab, wohl aber in der Wärme. Es ist nur in Wasser leicht löslich.

$C_4H_8O_5N_2 + H_2O$ (150.1). Ber. C 31.98, H 6.72, N 18.66. Gef. C 32.11, H 6.84, N 18.56.

$[\alpha]_D^{18} = +0.24^\circ \times 3.9616/1 \times 1.025 \times 0.0600 = +15.5^\circ$ (in $n/_{10}$ -Salzsäure).

N-Carbobenzoxyl-*l*-asparagin.

Die Lösung von 6.6 g *l*-Asparagin in 50 ccm Wasser, dem 4.3 g Magnesiumoxyd zugegeben waren, wurde bei mäßiger Kühlung mit 8.5 g Benzylester-kohlensäure-chlorid in Portionen versetzt. Nach dem Verschwinden des Geruchs des Säurechlorids wurde angesäuert und Carbobenzoxyl-asparagin fiel sofort krystallinisch aus. Aus Methanol Stäbchen vom Schmp. 165° (korr.). Ein Gemisch mit Carbobenzoxyl-*l*-iso-asparagin schmolz bei 153° (korr.). Ausbeute 7 g.

$C_{12}H_{14}O_5N_2$ (266.1). Ber. C 54.11, H 5.30, N 10.53. Gef. C 53.99, H 5.36, N 10.38.

$[\alpha]_D^{18} = +0.13^\circ \times 5.4566/1 \times 1.066 \times 0.0874 = +7.6^\circ$ (in Eisessig).

Schwer löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln, leicht löslich in heißem Wasser und heißem Alkohol. Der daraus mit Diazo-methan bereitete Methylester zeigte Schmp. 150° (korr.) und $[\alpha]_D^{20} = -2.0^\circ$ (in Eisessig). (CH_3O . Ber. 11.08. Gef. 10.99.)

Carbobenzoxyl-*d, l*-phenyl-alanin.

(Nach Versuchen von Hrn. Dipl.-Ing. Oskar Fritz Leinert).

Aus 6.6 g *d, l*-Phenyl-alanin in 20 ccm 2-*n*. Natronlauge mit 6.8 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und weiteren 20 ccm derselben Lauge.

Der beim Ansäuern erhaltene Niederschlag (9 g) wurde aus Tetrachlormethan umkrystallisiert, Prismen vom Schmp. 103°.

$C_{17}H_{17}O_4N$ (299.1). Ber. C 68.20, H 5.74, N 4.68. Gef. C 68.18, H 5.83, N 4.59.

N-Carbobenzoxyl-tyrosin.

Äthylester: Tyrosin-äthylester-Hydrochlorid wurde in Gegenwart von Chloroform und Natronlauge unter Schütteln mit Benzylester-kohlensäure-chlorid bei tiefer Temperatur, dann noch mit einer zweiten Portion Chlorid in Gegenwart von Soda behandelt und schließlich die Chloroform-Schicht aufgearbeitet. Erhalten wurden 80% d. Th. an Carbobenzoxyl-tyrosin-ester in großen, sternförmig angeordneten Prismen vom Schmp. 78°. Leicht löslich in den meisten organischen Mitteln, außer Petroläther.

$C_{19}H_{21}O_6N$ (343.2). Ber. C 66.46, H 6.17, N 4.08. Gef. C 66.68, H 6.28, N 4.10.

$[\alpha]_D^{25} = -0.08^\circ \times 2.3035/1 \times 0.898 \times 0.0441 = -4.7^\circ$ (in Alkohol).

Freie Säure: Der Ester wurde, in 2 Mol. *n*-Natronlauge gelöst, 15 Min. aufbewahrt. Beim Ansäuern schied sich die freie Säure als Öl ab, das bald in Nadeln krystallisierte. Ausbeute nahezu quantitativ.

Zur Reinigung wurde in heißer verd. Natriumacetat-Lösung gelöst, gekühlt, filtriert und allmählich mit verd. Salzsäure abgeschieden.

Die luft-tr. Subst. verlor bei 56° u. 0.1 mm über P_2O_5 10.31% an Gewicht (für $2H_2O$ ber. 10.25%).

$C_{17}H_{17}O_6N$ (315.1). Ber. C 64.74, H 5.44, N 4.45. Gef. C 64.89, H 5.48, N 4.41.

$[\alpha]_D^{20} = +0.36^\circ \times 3.7761/1 \times 1.069 \times 0.1151 = +11.1$ (in Eisessig).

Die getr. Substanz schmilzt bei 101°. Sie löst sich in den meisten organischen Mitteln leicht.

N-Monocarbobenzoxyl-*d*-arginin.

Die Lösung von 5.3 g *d*-Arginin in 30 ccm Wasser wurde mit 10 ccm Äther überschichtet und unter Eiskühlung mit 5.3 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und 15 ccm 2-*n*. Natronlauge in mehreren Portionen versetzt. Gegen Schluß der Umsetzung beginnt schon die Krystallisation des Produktes. Ausbeute 5.5 g. Nach dem Umlösen aus heißem Wasser, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt waren, bildete die Substanz lange Nadeln und schmolz bei 175° (korr.). Schwer löslich in kaltem Wasser und Alkohol. In den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln unlöslich.

$C_{18}H_{20}O_4N_4$ (308.2). Ber. C 54.51, H 6.54, N 18.18. Gef. C 54.42, H 6.55, N 18.12.

$[\alpha]_D^{20} = -0.53^\circ \times 4.1812/1 \times 1.034 \times 0.2319 = -9.2^\circ$ (in $n/6$ -Salzsäure).

N-Carbobenzoxyl-*l*-histidin.

Die Lösung von 2.1 g *l*-Histidin-Monohydrochlorid in 10 ccm 2-*n*. Natronlauge wurde bei 0° während 20 Min. portionsweise mit 3.4 g Benzylester-kohlensäure-chlorid und 15 ccm 2-*n*. Natronlauge versetzt. Nach Zugabe von 4.5 ccm 5-*n*. Salzsäure und etwa der gleichen Menge Eisessig wurde unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufs Filter gebracht und aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert. Die Ausbeute war sehr bescheiden. Schmp. 209° (korr.). Die Substanz ist nur in heißem Wasser und heißem Methanol leicht löslich.

$C_{14}H_{16}O_4N_2$ (289.2). Ber. C 58.09, H 5.23, N 14.54. Gef. C 58.11, H 5.20, N 14.23.

Carbobenzoxy-glycyl-glycin.

10 g Glycin-anhydrid wurden, in 50 ccm 2-n-Natronlauge gelöst, 30 Min. aufbewahrt und dann unter Kühlung mit 17 g Benzylesterkohlen säure-chlorid und 50 ccm 2-n. Natronlauge in mehreren Portionen behandelt. Beim Ansäuern lange Nadeln, die nach Krystallisation aus Methanol bei 178° schmolzen. Ausbeute etwa 70% d. Th. Leicht löslich in heißem Wasser und Alkohol.

$C_{12}H_{14}O_5N_2$ (266.1). Ber. C 54.11, H 5.30, N 10.53. Gef. C 54.25, H 5.50, N 10.42.

d-Glutaminyl-*d*-glutaminsäure.

N-Carbobenzoxy-*d*-glutaminyl - *d* - glutaminsäure - diäthyl - ester (V): Die Lösungen von 3 g Carbobenzoxy-*d*-glutaminsäure-anhydrid (s. oben) und 5 g *d*-Glutaminsäure-diäthylester in trockenem Chloroform wurden vermischt, nach 5 Stdn. die Chloroform-Lösung 2-mal mit verd. Salzsäure gewaschen, getrocknet und im Vakuum vollständig verdampft. Beim Umkrystallisieren des Rückstands aus sehr wenig heißem absol. Alkohol erhielten wir etwa 2.8 g schöner Nadeln vom Schmp. 137° (korr.). Ziemlich löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln, schwer löslich in Wasser.

$C_{22}H_{30}O_8N_2$ (466.2). Ber. C 56.63, H 6.49, N 6.01. Gef. C 56.83, H 6.09, N 6.10.

Verseifung zum Carbobenzoxy-dipeptid: Der Ester wurde, in etwas mehr als der für 3 Mol. berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, 35 Min. bei 18° aufbewahrt. Mit 5-n. Salzsäure in kleinem Überschuß erhielten wir beim Stehen Nadeln in einer Ausbeute von 80% d. Th. Die Substanz sintert im Capillarrohr von etwa 145° ab, schmilzt aber erst gegen 176° (korr.). Vielleicht spielt dabei eine Wasser-Abspaltung mit.

$C_{18}H_{22}O_6N_2$ (410.2). Ber. C 52.66, H 5.41, N 6.83. Gef. C 52.61, H 5.60, N 6.95.

Freies Dipeptid (VI): Aus der Carbobenzoxy-Verbindung durch katalytische Hydrierung in quantitativer Ausbeute. Aus Wasser erhielten wir mit Alkohol dicke Tafeln vom Schmp. 205° (korr.).

$C_{10}H_{16}O_4N_2$ (276.1). Ber. C 43.46, H 5.84, N 10.15. Gef. C 43.49, H 5.99, N 10.32.

$[\alpha]_D^{20} = +0.41^\circ \times 5.0475/1 \times 1.027 \times 0.1011 = +19.9^\circ$ (in Wasser, das 1 Mol. Salzsäure enthält).

Das Dipeptid löst sich nur in Wasser beträchtlich. In Wasser, wie in 90-proz. Äthylalkohol verbraucht es 3 Mol. Kalilauge zur Neutralisation mit Thymol-phthalein als Indicator:

0.0160 g Sbst.: 3.41 ccm n_{20} -KOH (in Wasser); ber. 3.46 ccm. — 0.0276 g Sbst.: 6.0 ccm n_{20} -KOH (in 90-proz. Alkohol); ber. 6.0 ccm.

Durch den 1 Tag alten Extrakt aus frischer Pankreas wird *d*-Glutaminyl-*d*-glutaminsäure leicht gespalten. Beim Versuchs-Ansatz waren in 5 ccm enthalten: 0.0275 g Peptid, 0.20 ccm n_{15} -Ammoniak-Lösung, 0.50 ccm m_{13} -Phosphat-Puffer und 1 ccm Enzym-Lösung. Die Titrationsprobe von 2 ccm zeigte nach 2 Stdn. einen Zuwachs von 0.53 ccm n_{20} -Kalilauge, was einer Spaltung von 66% entspricht. Ein zweiter Ansatz mit 0.41 g Peptid zeigte unter den gleichen Bedingungen 79% Spaltung.

l-Asparagyl-*l*-tyrosin (VIII).

Carbobenzoxy-*l*-asparagyl-*l*-tyrosin-äthylester: Die eisgekühlte Lösung von 4.4 g *l*-Tyrosinester-Hydrochlorid in 15 ccm wasser-freiem

Pyridin wurde mit 4 g Carbobenzoxy-*l*-asparaginsäure-anhydrid 2 Stdn. bei Raum-Temperatur aufbewahrt, dann mit Wasser verdünnt und mit 150 ccm Äther und 40 ccm 5-n. Salzsäure kräftig geschüttelt. Beide Schichten schieden bald Krystalle ab, die, aus Alkohol umgelöst, Nadeln vom Schmp. 203° (korr.) in einer Gesamtmenge von 2 g ergaben. Die ätherische Mutterlauge schied weiterhin Krystalle von viel tieferem Schmp. ab, die wir noch nicht untersucht haben.

$C_{23}H_{26}O_8N_2$ (458.2). Ber. C 60.24, H 5.72, N 6.11. Gef. C 60.30, H 5.85, N 6.00.

Die Verseifung der Äthylestergruppen zum freien Carbobenzoxy-dipeptid mit 3 Mol. 2-n. Natronlauge während 45 Min. bei 18° ergab beim Ansäuern lange Nadeln in quantitativer Ausbeute vom Schmp. 110°. Sie enthielten 1 Mol. Krystallwasser, das selbst im Hochvakuum bei 78° kaum zu entfernen war.

Zur Analyse diente die luft-trockne Substanz.

$C_{21}H_{21}O_8N_2 + H_2O$ (448.2). Ber. N 6.25. Gef. N 6.19.

Die Verbindung löst sich in den meisten organischen Mitteln leicht, dagegen schwer in kaltem Wasser.

Freies Dipeptid: Aus der eben beschriebenen Carbobenzoxy-Verbindung durch Hydrierung in Gegenwart von Palladiummohr, Filtrieren und Eindampfen. Der Rückstand gab, in sehr wenig Wasser gelöst und mit viel absol. Alkohol versetzt, in quantitativer Ausbeute dicke Tafeln. Das Dipeptid färbt sich gegen 230° dunkel. Es löst sich nur in Wasser und in viel heißem Methanol.

$C_{19}H_{18}O_8N_2$ (296.1). Ber. C 52.68, H 5.45, N 9.46. Gef. C 52.76, H 5.55, N 9.38.

$[\alpha]_D^{18} = +1.43^\circ \times 3.9909/1 \times 1.026 \times 0.0926 = +60.1^\circ$ (in Wasser, das 1 Mol. HCl enthielt).

227. Max Bergmann und Leonidas Zervas: Über die Synthese von Glucopeptiden des *d*-Glucosamins (*N*-Glycyl-*d*-glucosamin und *N*-*d*-Alanyl-*d*-glucosamin).

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung in Dresden.]

(Eingegangen am 18. Juni 1932.)

Vor einem Jahr haben wir ein Verfahren mitgeteilt, das zur Synthese von Glucopeptiden dienen sollte, indem es die partielle Substitution der Aminogruppe des Glucosamins ermöglichte. Wir besetzten zunächst die Aminogruppe des Glucosamins mit Anisaldehyd, acetylierten die entstandene Schiffsche Base zur Tetracetylverbindung, spalteten den Anisaldehyd wieder ab und konnten nun in die wieder freigelegte Aminogruppe unschwer verschiedene Acylgruppen einführen. Wenn wir dann hinterher mit Alkalien die *O*-Acetyle abgespalteten, blieb das zuletzt eingeführte Acyl am Stickstoff sitzen¹⁾. Trotz der verschiedenen erforderlichen Zwischenstufen verliefen derartige Synthesen quantitativ sehr befriedigend.

¹⁾ B. 64, 975 [1931]. Dort sind die verschiedenen Stufen des Verfahrens durch Formeln veranschaulicht.