

le tout, porté à reflux. Les produits neutres issus de la réaction (6,7 g) ont été traités par l'acétate de semicarbazine. Le mélange brut des semicarbazones (8,4 g), F. 116–122°, a été recristallisé dans le méthanol à 20% d'eau. Il a été impossible d'en dégager une semicarbazone parfaitement définie.

Dinitro-2,4-phénylhydrazones. 2,3 g de fractions de semicarbazones F. 168–169° ont été convertis en dinitrophénylhydrazones par hydrolyse dans le méthanol en présence de dinitrophénhydrazine et d'acide chlorhydrique en léger excès. Par recristallisations des dinitrophénylhydrazones brutes il a été obtenu deux dérivés; (I) F. 146–147° est celui de la nopinone, l'autre (II) F. 150,5–151,5° est celui d'une cétone bicyclique $C_{10}H_{16}O$.

(I) $C_{15}H_{18}O_4N_4$ (318,33) Calc. C 56,59 H 5,70 N 17,60% Tr. C 56,40 H 6,21 N 17,58% $[\alpha]_D^{21} = +34,0^\circ$ ($CHCl_3$; $c = 0,01$).

Spectre IR.: 3205 (f); 3012 (ff); 2873 (FF); 1607–1582 (b. crén., FF); 1529 (m); 1497 (F); 1458 (F); 1433 (f); 1408 (F); 1362 (m); 1333–1305 (b. crén., FF); 1263 (FF) avec 1243 (sh); 1217–1208 (b. crén., F); 1126 (F); 1070 (F); 1042 (mf); 960 (f); 926–916 (b. crén., m); 880 (f); 870 (f); 846 (F); 833 (mf); 779 (f); 763 (f); 744 (F); 728 (m); 693 (f); 678 (m).

Elle a été comparée à la dinitrophénylhydrazone de la (+)-nopinone, préparée à partir du (−)-nopinène, qui F. 146–147,5°; $[\alpha]_D^{21} = -36,0^\circ$ ($CHCl_3$; $c = 0,01$); et dont le spectre IR. est identique.

(II) $C_{16}H_{20}O_4N_4$ (332,35) Calc. C 57,82 H 6,07 N 16,86% Tr. C 57,83 H 6,13 N 16,84% $[\alpha]_D^{21} = +4^\circ$ ($CHCl_3$; $c = 0,01$).

Spectre IR.: 3247 (f); 3049 (f); 2873 (FF) avec 2825 (sh); 1607–1587 (b. crén., FF); 1515–1501 (b. crén., F); 1458 (m); 1414 (F); 1366 (m); 1333–1312 (b. crén., FF); 1275 (F); 1247 (m); 1222 (mf); 1149 (m); 1104 (m); 1070 (mf); 1044 (m); 994 (f); 928 (m); 916 (f); 886 (f); 865 (f); 837 (mf); 779 (f); 767 (f); 745 (m); 729 (mf).

SUMMARY

An authentic oil of lavender of French origin contains, besides β -myrcene, traces of Δ_3 -carene, dipentene and α -ocimene: approximately 0,01% each of (+)-nopinene and sabinene.

Laboratoires de recherches de
L. GIVAUDAN & CIE, S.A., Vernier-Genève

Note ajoutée lors de la correction (14. XI. 1960). – H. M. WALBORSKY, T. SUGITA, M. OHNO & Y. INOUYE (J. Amer. chem. Soc. 82, 5256 (1960)) viennent d'établir la configuration absolue de l'acide (−)-*cis*-umbellularique d'où résulte celle du (+)-sabinène.

Au (+)-sabinène et donc au (+)-terpinène-1-ol-4 correspond le (−)-limonène et donc la (−)-cryptone. Ainsi est vérifiée la validité des conclusions figurant dans la communication précédente.

266. Zur Polykondensation der α -Aminosäureester

von M. BRENNER und H. R. RICKENBACHER

(29. IX. 60)

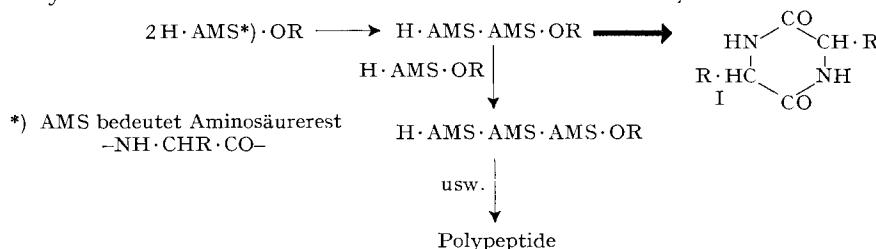
Die α -Aminosäureester haben bis heute als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Aminosäurepolykondensaten fast keine Bedeutung. Polypeptide sind in der Regel nur in sehr schlechten Ausbeuten erhältlich¹⁾. Hauptprodukte der Kondensation sind cyclisierte Dipeptide²⁾ (Dioxopiperazine (I)). Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit der CAROTHERS'schen Regel³⁾, wonach Kondensationen, die

¹⁾ Vgl. M. FRANKEL & E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 64, 2264, 2268 (1942).

²⁾ Vgl. E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 442, 448 (1901).

³⁾ W. H. CAROTHERS, J. Amer. chem. Soc. 51, 2548 (1929).

zu Fünf- oder Sechs-Ringen führen können, praktisch vollständig unter Ringbildung verlaufen. Eine Ausnahme bildet nur die Synthese von Polyglycin aus Glycin-estern¹⁾⁴⁾. Aus bis jetzt unerforschten Gründen erfolgt sie entgegen der Regel von CAROTHERS besonders leicht. Polyglycin kann sogar aus Glycin-dioxopiperazin hergestellt werden⁵⁾. Im allgemeinen aber erfordert die Polypeptidsynthese Kunstgriffe, welche entweder die Entstehung des sechsgliedrigen Dioxopiperazinringes (I) verhindern⁶⁾ oder aber diejenigen Reaktionen beschleunigen, welche zur Kettenbildung führen. Ein Beispiel für die letztere Möglichkeit bietet die spezifische Katalyse der Polykondensation der α -Aminosäureester durch Fermente⁷⁾.



In einer vorläufigen Mitteilung⁸⁾ erwähnen BROCKMANN & MUSSO die Möglichkeit, die Polykondensation der α -Aminosäureester durch Zusatz von «Protonenfängern» zu begünstigen. Mit Äther verdünnter Glycin- bzw. DL-Alanin-methylester gab in Gegenwart von Tritbynatrium die entsprechenden Polyaminosäuren vom Polymerisationsgrad 12 bis 13; genauere Angaben fehlen.

Unabhängig davon haben wir beobachtet, dass die Methylester der funktionell einfacheren Aminosäuren (Leucin, Lysin, Asparaginsäure) unter der Einwirkung von pulverisiertem Natrium ein hauptsächlich aus Polypeptiden und Dioxopiperazin bestehendes Gemisch ergeben⁹). Die stark exotherme Umsetzung wird bei 0–5° durchgeführt und ist dann nach einigen Stunden beendet¹⁰).

Im Falle des Leucinesters wird eine harte Masse erhalten. Zur Aufarbeitung wird mit Methanol zersetzt, mit Wasser verdünnt und der Brei mit Eisessig lackmussauer gestellt. Durch Filtration erhält man den in Wasser unlöslichen Anteil des Kondensationsprodukts in salzfreiem Zustand.

Diese Substanz kann bei 100° im Wasserstrahlpumpenvakuum nicht vollständig getrocknet werden. Das vom scheinbar trockenen Material hartnäckig zurückgehaltene Wasser (ca. 14%) wird erst allmählich bei 0,02 Torr über P_2O_5 abgegeben. Der trockene Rückstand (Ausbeute 60–70 Proz. d. Th.) besteht zu rund 2% aus Di-

⁴⁾ a) TH. CURTIUS, Ber. deutsch. chem. Ges. 37, 1284 (1904); b) E. KATCHALSKI & M. SELA, Advances Protein Chemistry 13, 243 (1958).

5) A. B. MEGGY, J. chem. Soc. 1956, 1444.

⁶⁾ Vgl. M. GOODMAN & G. W. KENNER, Advances Protein Chemistry, Vol. XII, S. 465, New York 1957; W. GRASSMANN & E. WUENSCH, in L. ZECHMEISTER, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 13, 444, Wien 1956.

7) M. BRENNER, H. R. MUELLER & R. W. PFISTER, *Helv.* 33, 568 (1950); M. BRENNER & R. W. PFISTER, *Helv.* 34, 2085 (1951); M. BRENNER, H. R. MUELLER & EVA LICHTENBERG, *Helv.* 35, 217 (1952); M. BRENNER, H. R. MUELLER & A. VETTERLI, *Helv.* 35, 227 (1952).

⁸⁾ H. BROCKMANN & H. MUSSO, *Naturwiss.* **40**, 553 (1953).

⁹⁾ Vgl. Dissertation von H. R. RICKENBACHER, Universität Basel, 1952.

¹⁰⁾ Vgl. dazu die lange Reaktionsdauer bei FRANKEL & KATCHALSKI¹⁾.

isobutyl-dioxopiperazin und zu rund $\frac{3}{5}$ aus Leucinpeptiden. Die Trennung in Peptide und Dioxopiperazin gelingt bei kleinen Mengen leicht durch Vakuumsublimation. Für eine präparative Trennung ist es günstiger, das Leucin-dioxopiperazin mit konz. Mineralsäuren (65-proz. H_2SO_4 oder 36-proz. HCl) als Oxoniumsalz herauszulösen; aus solchen Lösungen lässt es sich durch Verdünnen mit Wasser grossenteils unverändert wieder ausfällen. Nach einer ersten Säurebehandlung beträgt der Dioxopiperazingehalt im Säure-unlöslichen Anteil noch rund 14%, und nach zwei weiteren Behandlungen etwa 3%. Das derart gereinigte und anschliessend säurefrei gewaschene Kondensat entspricht mengenmässig etwa $\frac{1}{3}$ des eingesetzten Leucin-methylesters. – Organische Lösungsmittel sind zum Herauslösen des Dioxopiperazins viel weniger geeignet. Für die Erzielung einer wirkungsvollen Trennung scheint somit die Aufspaltung von intermolekularen Wasserstoffbrücken von Bedeutung zu sein.

Das in Wasser und konz. Mineralsäure schwerlösliche Kondensationsprodukt wird bei der Ninhydrinreaktion im Reagensglas blau, bei der Biuretreaktion rot-violett angefärbt, während die wässrige Phase in beiden Fällen farblos bleibt¹¹⁾. Es ist in Methanol wenig löslich; in Eisessig und Pyridin lösen sich etwa 75 Prozent der Substanz. Für die nachfolgend beschriebenen analytischen Untersuchungen diente der pyridinlösliche Anteil: Die Pyridinlösung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 2N Essigsäure suspendiert, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum bei 100° über P_2O_5 zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Titrimetrisch wurden mittlere Molekulargewichte von 1250 (Titration mit Kaliumhydroxyd in Methanol-Isopropanol), bzw. 1130 (Titration mit Perchlorsäure in Eisessig) gefunden. Die mittlere Molekulargrösse des Produkts entspricht demnach etwa derjenigen des Decapeptids (Molekulargewicht 1130). Unter Annahme eines Restgehaltes an Feuchtigkeit von 1,5% stimmen auch die Verbrennungswerte auf Leucidekapeptid.

Tabelle 1. *Hydrolysenlösung von Polyleucin, analytische Daten*

	Total-N (KJELDAHL)	NH ₂ -N		Aminosäure-CO ₂		NH ₄ ⁺ -N	
		mg	% a)	mg	% a)	mg	% a)
Hydrolysenlösung .	33,42 mg N	32,15	96,2	101,6	96,7	0,553	1,65
Vergleichslösung .	34,76 mg N	34,87	100,3	109,2	100,0	--	--

a) Bezogen auf Totalstickstoff.

Bei 15stündiger Hydrolyse mit 6N Salzsäure im Bombenrohr bei 145° wird praktisch reines Leucin zurückerhalten. Dies ergibt sich einerseits aus dem papierchromatographischen Vergleich des Hydrolysats mit einer Leucinlösung ähnlicher Konzentration und andererseits (s. Tab. 1) aus Bestimmungen von Totalstickstoff, Amino-Stickstoff und Ninhydrin-CO₂ in der Hydrolysenlösung, die mit den an einer Vergleichs-Leucinlösung ähnlicher Konzentration bestimmten Zahlen verglichen wurden. Die Genauigkeit der Messungen beträgt $\pm 2\%$.

¹¹⁾ Nach E. ABDERHALDEN & R. FLEISCHMANN, Fermentforsch. 9, 524 (Chem. Zbl. 1928, II, 580) ist bereits L-Leucyl-L-leucyl-L-leucin in Wasser unlöslich.

Die Werte für α -Aminosäure- CO_2 und Amino-Stickstoff stehen unter sich in bester Übereinstimmung und entsprechen auch im Hydrolysat bei Berücksichtigung des Ammonium-Stickstoffs (1,65%) innerhalb der Fehlergrenze dem vorhandenen Totalstickstoff. Das gereinigte Kondensat ist demnach ganz aus Leucinresten aufgebaut. Dieses Analysenergebnis schliesst insbesondere aus, dass das gereinigte Kondensat nennenswerte Mengen von Aminoketonen (z. B. II) oder Aminoacyloinen (z. B. III) enthielt.



Die Entstehung solcher Stoffe erscheint unter den energischen Bedingungen unserer Aminosäureester-Kondensation nicht ausgeschlossen; ihre Gegenwart hätte aber das Verhältnis von Amino-Stickstoff zu Ninhydrin- CO_2 verändern müssen, denn bei der Hydrolyse verwandeln sie sich nicht mehr in Leucin zurück¹²⁾.

Das zurückgewonnene Leucin ist racemisch. Der Verlust der optischen Aktivität erfolgt wahrscheinlich während der Kondensation und ist im Hinblick auf die Basizität des Milieus verständlich.

Das Kondensat von DL-Lysin-methylester ist wasserlöslich¹³⁾. Aus der mit Salzsäure lackmussauer gestellten, stark verdünnten wässrigen Lösung fällt Pikrinsäure ein öliges Pikrat. Dieses lässt sich mit kaltem Wasser natriumfrei waschen. Aus dem Pikrat wird auf übliche Weise ein gut wasserlösliches Hydrochlorid gewonnen. Entfernt man aus dessen wässriger Lösung mit dem stark basischen Ionenaustauscher Dowex-2 die Chlor-Ionen und dampft ein, so hinterbleibt das basische Kondensationsprodukt als eine glasige, Biuret- und Ninhydrin-positive Masse. Das gefundene Verhältnis N-Atome (KJELDAHL)/freie Carboxylgruppen (Titration mit methanolischer KOH in Isopropanol) von 13,6:1 weist auf einen mittleren Polymerisationsgrad von 7 hin, unter dem Vorbehalt, dass das Produkt weder Dioxopiperazin, noch α -Aminocaprolactam, noch unverseifte Estergruppen enthält. Bei der Hydrolyse werden 96,3% des Totalstickstoffs (KJELDAHL) als Lysin (kolorimetrisch bestimmt) zurückgehalten. Das isolierte Polylysin gibt ein amorphes Pikrat, dessen Verbrennungswerte auf die Formel $\text{H}(\text{Lys})_{6-11}\text{OH}$ (Pikrinsäure)₇₋₁₂ passen, was mit dem obigen Titrationsergebnis in guter Übereinstimmung steht.

Das ebenfalls wasserlösliche, aber dunkelbraune Kondensationsprodukt aus DL-Asparaginsäure-dimethylester ist durch Filtration über Amberlite IRC 50 und Amberlite IR 120 von Natrium-Ionen und niedrigmolekularen kationischen Begleitstoffen befreit worden. Mit Cu^{2+} -Ionen entsteht eine intensiv grüne Farbe, während BERGER & KATCHALSKI¹⁴⁾ bei ihrer Polyasparaginsäure vom MG 9200 eine grüne Fällung beobachteten. Im Gegensatz zu BERGER & FRANKEL¹⁵⁾ finden wir die Biuretprobe bei unserem Produkt negativ. Nach Verseifung mit Salzsäure reagierten

¹²⁾ Es ist immerhin denkbar, dass das Auftreten von Ammonium-Ionen im Hydrolysat (s. Tab. 1) wenigstens teilweise auf eine Zersetzung von Verbindungen des Typus II oder III zurückzuführen sind.

¹³⁾ Übersicht über synthetische Poly- α -aminosäuren siehe ^{4b)}.

¹⁴⁾ A. BERGER & E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 73, 4084 (1951).

¹⁵⁾ M. FRANKEL & A. BERGER, Nature [London] 163, 213 (1949).

nur 41% des Totalstickstoffs mit Ninhydrin. Die Natrium-induzierte Polykondensation von Asparaginsäure-dimethylester ist demnach in erheblichem Masse von Nebenreaktionen begleitet. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um Neubildung von C-C-Bindungen. Jedenfalls sind die konstitutionellen Voraussetzungen für diese Reaktionsweise beim Dimethylester der Asparaginsäure günstiger als beim Methyl-ester des Leucins (aktivierte Methylengruppe).

Es war zu erwarten, dass sich Asparaginsäure-dimethylester auch im Gemisch mit anderen Aminosäureestern ähnlich verhalten werde. Für die Herstellung von Produkten mit mehreren sauren Gruppen in der Molekel wurde er trotzdem herangezogen, da die Verwendung von Glutaminsäure-dimethylester als Reaktionspartner wegen der grossen Neigung zur Fünfring-Lactambildung (Pyrrolidoncarbonsäure-ester) ausser Betracht fällt.

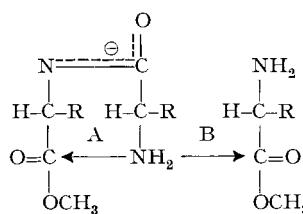
Bei der Kondensation eines Gemisches der Methylester von L-Leucin (1 Mol), DL-Lysin (0,227 Mol) und DL-Asparaginsäure (0,227 Mol) erhält man ein in Wasser relativ schwerlösliches Kondensationsprodukt in einer Ausbeute von 65% d. Th. Die Reinigung durch Behandlung mit starken Säuren ist hier mit grösseren Verlusten verbunden. Das salzsaure Hydrolysat des gereinigten Kondensationsproduktes enthielt bei einem Molverhältnis von Leu:Lys:Asp = 1:0,13:0,19 relativ weniger Lysin und Asparaginsäure als das ursprüngliche Estergemisch. Aus dem Gehalt an Leucin und Lysin und aus der titrimetrischen Bestimmung der Aminogruppen errechnet sich für das gereinigte Kondensationsprodukt ein mittleres Molekulargewicht von etwa 4000. Die Bestimmung der Carboxylgruppen ergab ein vom errechneten Sollwert abweichendes Resultat. Eine Übereinstimmung der Werte ergibt sich unter der Annahme, dass neben der auf normale Weise säureamidartig eingebauten Asparaginsäure im Kondensat eine ungefähr gleich grosse Menge aus Asparaginsäureester entstandener Nebenprodukte eingebaut sind, die nur gewichtsmässig, nicht aber bei der Carboxylgruppenbestimmung und der kolorimetrischen Aminosäurebestimmung im Hydrolysat in Erscheinung treten. Ähnlich müssen die Hydrolysen- und Titrations-Ergebnisse beim Mischkondensat aus Leucinester und Asparaginsäureester interpretiert werden. Beim Kondensationsprodukt aus Leucin- und Lysin-methylester (mittleres Molekulargewicht 2000) stimmen die Titrationswerte (basische und saure Gruppen) mit der Aminosäurezusammensetzung des Hydrolysats gut miteinander überein.

Mit den verschiedenen Produkten wurden einige Färbeversuche angestellt. Erwartungsgemäss zieht das anionische Helianthin stark auf das Leucin-Lysin- und das Leucin-Lysin-Asparaginsäure-Kondensat und nur schwach auf das reine Polyleucin und das Leucin-Asparaginsäure-Kondensat. Umgekehrt zeigt das kationische Malachitgrün starke Affinität zum Leucin-Asparaginsäure- bzw. Leucin-Lysin-Asparaginsäure-Kondensat und schwache Affinität zum reinen Polyleucin und zum Leucin-Lysin-Kondensat.

Was die Frage des möglichen Reaktionsmechanismus anbetrifft, so ist dabei ausdrücklich zwischen der Einwirkung von äquivalenten Mengen Natriumalkoholat und von metallischem Natrium zu unterscheiden.

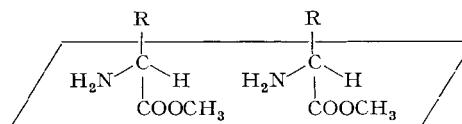
¹⁶⁾ C. K. INGOLD, Structure and Mechanism in Organic Chemistry, G. Bell & Sons. Ltd., London 1953, S. 757-758.

Natriumalkoholat und andere Protonenfänger hemmen mehr oder weniger wirksam die Cyclisierung zu Dioxopiperazinen²⁾ und begünstigen dadurch die lineare Kondensation von Aminosäureestern⁸⁾. Die Änderung der Reaktionsrichtung muss offensichtlich auf der Stufe des Dipeptidesters erfolgen. Wir führen sie auf die Ionisierung der Peptidbindung zurück. Die negative Ladung vermindert induktiv¹⁶⁾ die Reaktivität des Dipeptidester-carbonyls und benachteiligt so die intramolekulare Aminolyse nach A gegenüber der intermolekularen Aminolyse nach B mit der nicht gehemmten Carbonylgruppe eines Aminosäureesters.



Eine gleichzeitig erhöhte Nucleophilie der Aminogruppe wirkt auf beide Reaktionsarten aktivierend und ist deshalb ohne dirigierenden Einfluss. Abgesehen von ihrem induktiven Effekt dürfte die negative Ladung den Doppelbindungscharakter der Peptidbindung vergrößern und dadurch die Ringbildungsreaktion noch einmal erschweren. Der Ringschluss erfordert nämlich in der Regel eine vorgängige Drehung um die N-C-Achse der Peptidbindung, da die α -C-Atome der beiden Aminosäure-Reste in bezug auf diese Achse normalerweise *trans*-ständig sind¹⁷⁾. Die Kondensation der Aminosäureester wird durch Alkoholatzusatz auch ausbeutemässig beeinflusst. Man erhält, wie eigene Versuche mit äquimolekularen Mengen Natriumalkoholat und Ester bestätigen, insgesamt weniger wasserunlösliche Kondensationsprodukte (Dioxopiperazine, Polypeptide)²⁾. Schon alkoholfreies Natriumalkoholat hat diese Wirkung. Sie ist wahrscheinlich einer Umkehrung der Kondensation (Alkoholyse) und vielleicht auch einer teilweisen Blockierung des Aminosäureesters durch Ausbildung von Alkoxyldaddukten $\text{NH}_2\text{--CHR--C(OR)}_2\text{--O}^-$ zuzuschreiben.

Bei der Natrium-induzierten Kondensation der Aminosäure-methylester findet man eine höhere Gesamtausbeute als bei der Einwirkung von Natriummethylat. Die höhere Ausbeute ist vielleicht dem anfänglichen Fehlen von Methanol und der tief gehaltenen Reaktionstemperatur zuzuschreiben. Wahrscheinlich spielt aber auch die Metalloberfläche eine erhebliche Rolle. Wir vermuten mit PRELOG *et al.*¹⁸⁾, dass die Estermoleküle mit ihren polaren Gruppen an der Oberfläche des Natriummetalls absorbiert werden (s. Figur). Wegen der dabei herrschenden sterisch günstigen Ver-



hältnisse werden rasch zahlreiche Peptidbindungen entstehen. Dabei ist die Cyclisierung von Dipeptidestern gegenüber der linearen Kondensation im Vergleich zu

¹⁷⁾ S. I. MIZUSHIMA, Adv. Prot. Chemistry 9, 299 (1954).

¹⁸⁾ V. PRELOG, L. FRENKIEL, MARGRIT KOBELT & P. BARMAN, Helv. 30, 1741 (1947).

den Verhältnissen, wie wir sie in Lösung antreffen und oben diskutiert haben, noch einmal benachteiligt. Dipeptidester mit *trans*-Konstellation an der Peptidbindung können nämlich ohne vorherige Desorption von der Oberfläche nicht in Dioxopiperazine übergehen; die unmittelbare Nachbarschaft zur Oberfläche steht der erforderlichen *trans* → *cis*-Umlagerung im Wege. Neben dieser direkten sterischen Wirkung ist der Oberfläche noch eine indirekte Wirkung zuzuschreiben: Als Folge der Oberflächenreaktion entsteht lokal hochkonzentriertes Natriummethylat, und es müssen demnach an der Oberfläche die Ladungseffekte der ionisierten Peptidbindung besonders wirksam werden. Wegen der ständigen Neubildung von Methylat ändert sich diese spezielle Situation erst nach dem Verschwinden des Natriums. In der angrenzenden Lösung ergeben sich bei allmählich steigender Methylatkonzentration langsam die oben besprochenen Verhältnisse der Alkoholat-dirigierten Kondensation. An der Natriumoberfläche entstehen demnach fast nur Polypeptide, in der Lösung Polypeptide und Dioxopiperazin, wobei natürlich anfangs die Oberflächenreaktion und später die Lösungsreaktion vorherrscht. Die experimentell gefundene durchschnittliche Zusammensetzung unserer Endprodukte lässt sich somit auf Grund der entwickelten Vorstellungen zwangslös interpretieren.

Experimenteller Teil

I. Kondensationen von L-Leucin-methylester.

L-Leucin-methylester und pulverisiertes Natrium. In 49 g trockenen L-Leucin-methylester¹⁹⁾ trägt man bei -10° auf einmal 8 g (1 g-Atom pro Mol Ester) frisch pulverisiertes, Xylol-feuchtes Natrium²⁰⁾ ein (500-ml-Dreihalskolben, Rührer, Ausschluss von Luftfeuchtigkeit und CO₂). Unter langsamer Wasserstoffentwicklung erwärmt sich das Gemisch auf 5° und wird, solange es sich rühren lässt (3 bis 4 Std.) auf dieser Temperatur gehalten. Wenn die Masse steif geworden ist, wird das Kühlbad entfernt; die Reaktion klingt dann unter Erwärmung auf 40 bis 50° aus. Die nunmehr hart gewordene Masse wird unter Kühlung mit 25 ml Methanol zersetzt und die klare Lösung in 100 ml eiskaltes Wasser gegossen; dabei fällt das Kondensat fast farblos aus. Nach Neutralisieren mit Eisessig wird es abgesaugt und bei 20 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 29 g, Wassergehalt 14%. Erst beim Trocknen im Hochvakuum wird die restliche Feuchtigkeit abgegeben (s. u.). Bei der Biuret- und Ninhydrin-Reaktion werden die in Wasser unlöslichen Knöllchen rotviolettblau bzw. dunkelblau angefärbt. Die Lösungen selbst bleiben farblos. Das essigsaurer Filtrat gibt positive Biuret- und Ninhydrin-Reaktionen.

L-Leucin-methylester und Natriummethylat in überschüssigem Methylalkohol. 1 ml L-Leucin-methylester und 375 mg in 3,2 ml Methanol gelöstes Na-Methylat werden am Rückflusskühler (Natronkalkrohr) 18 Std. gekocht; Ausgiessen in überschüssige 2*N* Essigsäure ergibt 300 mg farblose Flocken. Biuret- und Ninhydrin-Reaktionen positiv. Nicht näher untersucht.

L-Leucin-methylester und Natriummethylat. Molare Mengen werden 15 Std. bei 150° Badtemperatur gehalten. Gleiche Ausbeute und Reaktionen wie bei der Kondensation in Gegenwart von Methanol. Nicht näher untersucht.

A. Eigenschaften und Reinigung des mit pulverisiertem Natrium erhaltenen Kondensationsprodukts. — *Löslichkeiten.* In heissem Wasser sehr wenig löslich; teilweise löslich in Methanol, Äthanol, Isopropanol; fast vollständig löslich in Eisessig und Pyridin; unlöslich in Äther und Essigester.

¹⁹⁾ Das L-Leucin enthielt L-Isoleucin. Der i.V. destillierte Ester wurde mit 4 T. absol. Äther verdünnt und über Nacht mit 0,2 T. CaO geschüttelt. Nach Abfiltrieren vom CaO wurde im Vakuum destilliert (Natronkalkrohr an der Siedekapillare und CaCl₂-Rohr zwischen Wasserstrahlpumpe und Vorlage).

²⁰⁾ Hergestellt mit dem Vibro-Mischer (Dr. ing. HANS MÜLLER, Zürich) im eng passenden Kochglas in Xylol. Mittlerer Durchmesser der Natriumkörnchen 0,02 cm.

Dioxopiperazingehalt. Sublimation: Im einseitig geschlossenen Glasröhren werden 40 mg bei 0,02 Torr innert 30 Min. von 150° auf 180° erhitzt (Aluminiumblock). 30% sublimieren fort. Das Sublimat wird aus 95-proz. Alkohol umkristallisiert: Nadelchen vom Smp. 257–258° (korrig.); keine Smp.-Depression mit Leucin-dioxopiperazin, hergestellt aus dem Methylester desselben Leucins durch Erhitzen auf 180–190° nach FISCHER²¹⁾.

Reinigung. In der Reibschale wird 1 Gew.-Teil des Rohproduktes (ca. 14% Wasser enthaltend) mit 5 Vol.-Teilen 65-proz. Schwefelsäure gemahlen. Nach fünf Min. wird durch eine Glasnutsche abgesaugt und der Filterkuchen zweimal mit Säure nachgewaschen. Man suspendiert in 50 ml Wasser, versetzt unter Kühlung mit Natronlauge im schwachen Überschuss und stellt mit 2 N Essigsäure lackmussauer. Nach 15 Min. wird abgesaugt und bei 12 Torr und 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach zweimaliger Wiederholung des Prozesses beträgt die Ausbeute 32% bezogen auf L-Leucin-methylester, und der Dioxopiperazingehalt 2 bis 4%. 2,2 g des so gewonnenen Dioxopiperazin-freien, getrockneten Leucinkondensats werden in 66 ml warmem Pyridin gelöst und die Lösung durch eine Glasnutsche G3 gesaugt. Es hinterbleibt eine gallertige, nicht näher untersuchte Masse, welche möglicherweise aus höheren Peptiden besteht. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 2 N Essigsäure angerührt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 0,02 Torr über P₂O₅ bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute 1,4 g. Farbloses hygroskopisches Pulver.

B. Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* 280 mg Dioxopiperazin-freies und in Pyridin gereinigtes Leucin-Kondensat werden mit 29 ml HCl 1:1 im Bombenrohr 14 Std. auf 145° erhitzt. Von braunen Flocken (3,2 mg) wird durch eine Glasnutsche abgesaugt und das Filtrat zur Trockne verdampft. Zur Entfernung der Salzsäure werden vom Rückstand dreimal je 10 ml Wasser abdestilliert. Zum Schluss spült man in einen 10-ml-Masskolben²¹⁾.

a) *Totalstickstoff nach KJELDAHL.* Gef. in 0,5 ml Lösung: 1,668 und 1,676 mg N, oder 313,2 mg Leucin für die ganze Hydrolysenlösung.

b) *Aminogruppen nach VAN SLYKE²²⁾.* Gef. in 0,2 ml Lösung: 0,6306, 0,6530, 0,6446 mg N, oder 301,0 mg Leucin für die ganze Hydrolysenlösung.

c) *Aminosäure-CO₂ nach VAN SLYKE²³⁾.* Gef. in 0,2 ml Lösung: 2,01, 2,04, 2,05 mg Aminosäure-CO₂, entspr. 302,6 mg Leucin für die ganze Hydrolysenlösung.

d) *NH₄⁺-Ionen nach CONWAY²⁴⁾.* Gef. in 0,1 ml Hydrolysenlösung: 5,53 γ N (Mittel aus 6 Messungen); für die ganze Hydrolysenlösung: 553 γ Stickstoff.

e) *Optische Aktivität.* Die aus dem Hydrolysat gewonnene freie Aminosäure erwies sich als inaktiv (Lösung in 6 N HCl).

Titration mit HClO₄. 132,5 mg gereinigtes Polyleucin werden durch kurzes Erwärmen auf 50° in Eisessig gelöst und das Volumen auf 10 ml gestellt. Man titriert Anteile von je 2 ml mit 0,1000 N HClO₄ in Eisessig gegen α-Naphtholbenzein. Gef.: 11,75 μÄquiv. NH₂/ml Lösung (Mittelwert aus vier Titrationen). Äquivalentgewicht: 1128.

Titration mit KOH. 81,5 mg gereinigtes Polyleucin werden in Isopropylalkohol gelöst, die schwach trübe Lösung auf 5 ml gestellt und Anteile von je 1 ml mit 0,01 N KOH in Methanol gegen Phenolphthalein, am Schluss bei 70°, titriert. Nach Abzug des Blindwertes gefunden: 13,2 und 12,9 μÄquiv. COOH/ml Lösung. Äquivalentgewicht: 1250.

Verbrennungsanalyse und Methoxylbestimmung, berechnet auf Leucindecapeptid.

C ₆₀ H ₁₁₂ O ₁₁ N ₁₀ (1149,7)	Ber. C 62,67	H 9,82	N 12,19	CH ₃ O 0%
id. + 1,5% H ₂ O	„	61,72	9,84	12,00 „ 0%
	Gef.	„	61,41	9,59 „ 11,90 „ 0% (nach ZEISEL)

II. Kondensation von **DL-Lysin-methylester**

1,7 g **DL-Lysin-methylester²⁵⁾** (10,6 mMol) werden bei –10° mit 245 mg pulverisiertem Natrium (10,7 mg-Atome) versetzt (Rührer, Thermometer und Natronkalkrohr) und bei 5° gerührt; das Gemisch wird innert 2–3 Std. zähflüssig. Nach Stehen über Nacht bei Zimmer-

²¹⁾ Zum Vergleich wurden die analytischen Bestimmungen auch mit einer wässr. L-Leucinlösung bekannter Konzentration durchgeführt.

²²⁾ D. D. VAN SLYKE, J. biol. Chemistry 16, 121 (1913); 23, 407 (1915).

²³⁾ BAMANN-MYRBAECK, Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, Bd. 1, S. 1107–1116.

²⁴⁾ E. J. CONWAY, Micro-diffusion Analysis and Volumetric Error, London 1947.

²⁵⁾ E. FISCHER & U. SUZUKI, Ber. deutsch. chem. Ges. 38, 4181 (1905).

temperatur wird unter Kühlung mit 2 ml Methanol zersetzt und der Alkohol im Vakuum entfernt. Man löst in Wasser, neutralisiert mit 2 N Salzsäure bis eben lackmussauer, verdünnt auf 120 ml und versetzt die Lösung in der Wärme mit der heißen Lösung von 4,4 g Pikrinsäure (19,2 mMol) in 160 ml Wasser. Das ausgefallene zähe Öl wird kalt auf der Glasnutsche gewaschen und anschliessend im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,93 g, natriumfrei.

Das Produkt wird in 20 ml 1N Salzsäure gelöst und die Pikrinsäure über Nacht mit Äther im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat extrahiert. Nach Eindampfen der wässerigen Phase destilliert man im Vakuum noch dreimal Wasser vom Rückstand ab und erhält so 0,97 g Hydrochlorid als farbloses Öl. Man löst in 40 ml Wasser und entfernt die Chlor-Ionen mit dem Anionen-Austauscher DOWEX-2. Beim Eindampfen der Lösung hinterbleibt Polylysin als eine harte, glasige Masse.

Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* Polylysin (ca. 30 mg Trockensubstanz) wird mit 3 ml HCl 1:1 im Bombenrohr 14 Std. auf 140° erwärmt. Man dampft i.V. ein und destilliert vom Rückstand im Vakuum dreimal Wasser ab. Das kristallisierende Öl wird in Wasser gelöst und in einen 10-ml-Masskolben gespült.

a) *Totalstickstoff nach KJELDAHL.* In 2 ml Hydrolysenlösung gefunden: 10,40 und 10,42 mg Lysin, 2 HCl, entspr. 52,1 mg Lysin, 2 HCl in der ganzen Hydrolysenlösung.

b) *Kolorimetrische Lysinbestimmung.* Es wurde das Verfahren von BOISSONNAS²⁶⁾ verwendet, welches sich insbesondere bei der Bestimmung von Aminosäuregemischen, nach vorangegangener Papierelektrophorese, bewährte. – Aus einer Mikrometer-Bürette wird $1/100$ ml Hydrolysenlösung auf WHATMAN-Papier Nr. 1 aufgetropft. Nach Besprühen mit methanolischer KOH wird der Fleck ausgeschnitten, die Aminosäure extrahiert und kolorimetrisch bestimmt (BECKMAN Spektrophotometer, Modell DU). Die gegen eine Vergleichs-Lysinlösung bestimmten Werte ergaben für $1/100$ ml: 48,8, 48,6, 49,9, 52,1, 49,7 γ, im Mittel 50,1 γ Lysin, 2 HCl. In 10 ml Hydrolysenlösung: 50,1 mg Lysin, 2 HCl.

c) *DL-Lysin-dipikrat.* Das aus dem Hydrolysat erhaltene DL-Lysin-dipikrat hat einen Smp. 191–193° korrig.²⁷⁾ Misch-Smp. mit authentischem Material ohne Depression.

Titration mit KOH. Polylysin (ca. 60 mg Trockensubstanz) gelöst in 0,3 ml Wasser wird im Masskolben mit 85-proz. Isopropylalkohol auf 5 ml verdünnt. KJELDAHL-Analyse ergab 0,4940 und 0,4935 mMol Lysin bzw. Lysylreste für die ganze Lösung. Titration mit methanolischer KOH ergab 0,07225 mÄquiv. Carboxygruppen für die ganze Lösung. Verhältnis Lysinreste: – COOH = 6,8:1.

Pikrat von DL-Polylysin. Gereinigtes Polylysin wird ins Pikrat übergeführt (s. o.). Die Substanz wird bei 110° und 12 Torr zu einer pulverisierbaren Masse getrocknet. Smp. 125–130° (unkorr., geschlossenes Röhrchen). Mit Wasser versetzt, klebriges Öl, in heißem Wasser löslich, in kaltem schwer löslich.

H(Lys) ₇ OH, (C ₆ H ₈ O ₇ N ₃) ₈	Ber. C 39,33	H 4,04	N 19,36%
H(Lys) ₅ OH, (C ₆ H ₈ O ₇ N ₃) ₆	„ „	38,98%	
H(Lys) ₁₁ OH, (C ₆ H ₈ O ₇ N ₃) ₁₂	„ „	39,68%	
Gef. „ 39,36 „ 4,01 „ 19,44%			

III. Kondensation von DL-Asparaginsäure-dimethylester

16,1 g DL-Asparaginsäure-dimethylester (0,1 Mol) werden bei –10° mit 5,1 g (0,22 g-Atom) pulverisiertem Natrium versetzt (Rührer, Thermometer, Natronkalkrohr). Unter langsamer Wasserstoffentwicklung wird das Gemisch bei 5° innert 6 Std. zähflüssig. Nach Stehen über Nacht versetzt man unter Kühlung mit 50 ml Methanol, destilliert den Alkohol im Vakuum wieder ab und löst in 200 ml Wasser. Durch Behandlung mit Ionenaustauschern im Überschuss werden die Natrium-Ionen entfernt. Zuerst wird die Lösung mit 20 g feuchtem Carboxyl-Kunstharz IRC-50 gerührt (Kapazität des feuchten Harzes ca. 12 mÄquiv./g), dann mit 60 g feuchtem Sulfosäure-Harz Amberlite IR 120 (Kapazität des feuchten Harzes $1\frac{1}{2}$ –2 mÄquiv./g). Anschliessend passiert sie noch ein Chromatographierohr mit 60 g feuchtem Amberlite IR 120. Die lacksmussaure Lösung wird im Vakuum zur Trockne verdampft. Ausbeute: 7,50 g (65%) braunes, flockiges Pulver. Positive Ninhydrin- und negative Biuret-Reaktion. Leicht löslich in Wasser, unlöslich in Aceton und Chloroform. Mit Cu²⁺-Ionen grasgrüne Farbe, mit Pb²⁺-Ionen Fällung.

²⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, Helv. 33, 1975 (1950).

²⁷⁾ D. W. ADAMSON, J. chem. Soc. 1939, 1566, gibt an: Smp. 188–190°.

Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* 54,3 mg Polyasparaginsäure (Na-frei) werden mit 4 ml HCl 1:1 im Bombenrohr bei 140° 14 Std. hydrolysiert. Von braunen Flocken wird durch eine Glasnutsche abgesaugt und das Filtrat im Vakuum zur Trockne verdampft. Vom Rückstand wird dreimal im Vakuum Wasser abdestilliert. Man spült in einen 10-ml-Masskolben.

a) *Totalstickstoff nach KJELDAHL.* Gef. in 2 ml Lösung: 1,200 mg N, oder 57,2 mg Asparaginsäure für die ganze Hydrolysenlösung.

b) *Kolorimetrische Aminosäurebestimmung.* Verwendet wurde die Methode von BOISSONNAS²⁶⁾. Die gegen eine Asparaginsäurelösung bekannter Konzentration erhaltenen Werte betragen für $1/_{100}$ ml: 23,5, 23,5, 24,3, 23,8, 23,4, 23,6 γ, oder 23,7 mg Asparaginsäure für die ganze Hydrolysenlösung. Dies entspricht nur 42% des in der Hydrolysenlösung gefundenen Stickstoffs.

Titration mit HClO₄. 57 mg Substanz werden in Eisessig gelöst, die Lösung auf 10 ml gestellt und Anteile von 2 ml mit 0,1000 N HClO₄ in Eisessig gegen α-Naphtolbenzein titriert. Gef.: 0,0123, 0,0125, 0,0128 mÄquiv. NH₂/ml Lösung, entspr. 1 Äquiv. NH₂ in 460 g Substanz. Diese Zahl kann nicht als mit dem Molekulargewicht identisch betrachtet werden, da der grossenteils nicht-säureamid-artige Aufbau des Kondensats erwiesen ist.

Titration mit KOH. 40,6 mg Substanz werden in 85-proz. Isopropylalkohol gelöst, die Lösung auf 5 ml gestellt und Anteile von je 1 ml mit 0,00768 N KOH in Methanol gegen Phenolphthalein titriert. Gef.: 0,0715, 0,0704, 0,0710 mÄquiv. COOH/ml Lösung, entspr. 1 Äquiv. COOH auf 115 g Substanz.

IV. Kondensation eines Gemisches von Leucin-, Lysin- und Asparaginsäure-Ester

Das Gemisch aus L-Leucin¹⁹⁾-methylester (16 g), DL-Lysin-methylester (4 g) und DL-Asparaginsäure-dimethylester (4 g) wird mit pulverisiertem Natrium (4 g) kondensiert und aufgearbeitet, wie für L-Leucin-methylester (s. o. sub I) beschrieben. Ausbeute an wasserunlöslichem Kondensat: 12 g. 25% sublimieren im Hochvakuum bei 150–180° fort. Bei der Schwefelsäure-Reinigung beträgt der Verlust 65%. Nach zweimaliger Reinigung sublimieren noch 1%. Zur Analyse wird durch Lösen in 20 Vol.-Teilen Pyridin bei 60°, Filtrieren dieser Lösung durch eine Glasnutsche G3, Abdestillieren des Pyridins im Vakuum und Aufnehmen in wässriger Essigsäure noch weiter gereinigt. Man trocknet im Hochvakuum über P₂O₅ 2 Std. bei 100°.

Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* 82,4 mg gereinigtes Kondensationsprodukt werden mit 6,2 ml HCl 1:1 16 Std. im Bombenrohr bei 135° hydrolysiert. Man entfernt die Salzsäure im Vakuum, dampft vom Rückstand dreimal Wasser ab und spült in einen 10-ml-Masskolben. Je $1/_{100}$ ml dieser Lösung werden auf Papierstreifen WHATMAN Nr. 1 aufgetropft und die Aminosäuren papierelektrophoretisch voneinander getrennt²⁸⁾. Quantitative Bestimmung erfolgt nach BOISSONNAS²⁶⁾ im Vergleich mit einer Lösung, die bekannte Mengen aller drei Aminosäuren enthält, welche ebenfalls papierelektrophoretisch voneinander getrennt werden. Gefunden: Leucin: 63,0, 60,1, 54,8 mg; Mittelwert: 59,3 mg; Lysin, 2 HCl: 12,7, 14,1, 10,95 mg; Mittelwert: 12,6 mg; Asparaginsäure: 13,25, 11,4, 9,20 mg; Mittelwert: 11,3 mg. Die Summe der Gewichte der Aminosäurereste (Aminosäure minus H₂O) ergibt nur 68,3 mg. Unter der Annahme, dass im Kondensat nur etwa die Hälfte der Asparaginsäure säureamidartig einkondensiert und im Hydrolysat kolorimetrisch als Asparaginsäure fassbar ist, besteht innerhalb der Fehlergrenzen Übereinstimmung mit dem Gewicht der Einwage.

Titration mit HClO₄. 101,1 mg gereinigtes Kondensat werden in Eisessig gelöst, die Lösung auf 10 ml gestellt und Anteile von je 2 ml mit 0,1000 N HClO₄ in Eisessig gegen α-Naphtolbenzein titriert. Gef.: 0,00975, 0,0102 mÄquiv. NH₂/ml Lösung. In 101,1 mg Kondensat sind somit 0,0995 mÄquiv. NH₂-Gruppen vorhanden. Da 0,0706 mÄquiv. auf Aminogruppen des Lysins entfallen, bleiben für Amino-Endgruppen 0,0259 mÄquiv. übrig. Molekulargewicht: 3900.

Titration mit KOH. 28,4 mg gereinigtes Kondensat werden in Isopropylalkohol gelöst, die Lösung auf 5 ml gestellt und Anteile von je 1 ml mit 0,00768 N KOH in Methanol gegen Phenolphthalein titriert. Im Verlaufe der Titration wurde die trübe Lösung klar. Gef.: 5,46 und 5,19 μ Äquiv. COOH/ml-Lösung, entspr. 3,66 Äquiv. COOH in 3900 g Kondensationsprodukt.

Als wahrscheinliche mittlere Zusammensetzung des Kondensats ergibt sich ein Aufbau aus 22 Leucin-, 3 Lysin-, 4 säureamidartig und 4 andersartig eingebauten Asparaginsäure-Resten.

²⁸⁾ Citratpuffer vom pH 6; Länge der Papierstreifen 30 cm; Gleichspannung von 320 Volt.

V. Kondensation eines Gemisches von Leucin- und Lysin-Ester

Das Gemisch aus 11,9 g L-Leucin¹⁹-methylester und 2,5 g DL-Lysin-methylester wird mit 2,5 g pulverisiertem Natrium kondensiert und aufgearbeitet, wie für L-Leucin-methylester (s. o. sub I) beschrieben. Ausbeute an wasserunlöslichem Kondensat: 8,4 g. 20% sublimieren im Hochvakuum bei 150–180° fort. Das Rohprodukt wird durch Lösen in Pyridin, Filtrieren usw. (s. o.) gereinigt.

Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* 75 mg des gereinigten Kondensationsprodukts werden mit 6,1 ml HCl 1:1 16 Std. im Bombenrohr bei 135° versetzt. Papierelektrophorese und Bestimmungen der Aminosäuren wie oben. Gefunden:

Leucin: 84,5, 78,5 mg; Mittelwert: 81,6 mg
Lysin, 2HCl: 13,8, 10,2 mg; Mittelwert: 11,9 mg

Die Summe der Gewichte der Aminosäurereste ergibt in guter Übereinstimmung mit der Einwage 77,2 mg.

Titration mit HClO₄. 99,9 mg gereinigtes Kondensationsprodukt werden in Eisessig gelöst, die Lösung auf 10 ml gestellt und Anteile von je 2 ml mit 0,1000 N HClO₄ in Eisessig gegen α -Naphtholbenzien titriert. Gef.: 0,0118, 0,0122, 0,0127 mÄquiv. NH₂/ml Lösung; in 99,9 mg Kondensat sind somit 0,122 mÄquiv. NH₂-Gruppen vorhanden. Da 0,072 mÄquiv. auf Aminogruppen des Lysins entfallen, bleiben für Amino-Endgruppen 0,050 mÄquiv. übrig. Molekulargewicht: 2000.

Titration mit KOH. 51,0 mg gereinigtes Kondensationsprodukt werden in Isopropylalkohol gelöst, die Lösung auf 5 ml gestellt und Anteile von je 1 ml mit 0,00768 N KOH in Methanol gegen Phenolphthalein titriert. Im Verlaufe der Titration wurde die trübe Lösung klar. Gef.: 6,54, 6,38 μ Äquiv. COOH/ml Lösung, entspr. 1,26 Äquiv. COOH in 2000 g Substanz.

Es ergibt sich eine wahrscheinliche *mittlere Zusammensetzung* aus 16 Leucin- und 1,5 Lysin-Resten.

VI. Kondensation eines Gemisches von Leucin- und Asparaginsäure-ester

Das Gemisch aus 14,25 g L-Leucin¹⁹-methylester und 3,45 g DL-Asparaginsäuredimethylester wird mit 3,25 g pulverisiertem Natrium kondensiert und aufgearbeitet, wie für L-Leucin-methylester (s. o. sub I) beschrieben. Ausbeute an wasserunlöslichem Kondensat: 8,4 g. Bei der Sublimation im Hochvakuum bei 150–180° sublimieren 40% fort. Nach zweimaliger Reinigung mit 65-proz. Schwefelsäure sublimieren noch 10%. Für die analytischen Untersuchungen wurde diese Substanz verwendet, nachdem sie noch durch Lösen in Pyridin, Filtrieren usw. (s. o.) gereinigt worden war.

Analytische Untersuchungen. – *Hydrolyse.* 56,7 mg gereinigtes Kondensat werden mit 5,1 ml HCl 1:1 im Bombenrohr 16 Std. bei 135° hydrolysiert. Papierelektrophorese und Bestimmungen der Aminosäuren wie oben. Gefunden:

Leucin: 46,2, 46,6, 46,3 mg; Mittelwert: 46,3 mg
Asparaginsäure: 8,1, 6,2, 5,5 mg; Mittelwert: 6,6 mg

Die Summe der Gewichte der Aminosäurereste ergibt 47 mg. Übereinstimmung mit der Einwage innerhalb der Fehlergrenzen wird erreicht, wenn man annimmt, dass im Kondensat nur die Hälfte der Asparaginsäure säureamidartig einkondensiert und im Hydrolysat kolorimetrisch als Asparaginsäure erfassbar sei.

Titration mit HClO₄. 99,4 mg gereinigtes Kondensationsprodukt werden in Eisessig gelöst und das Volumen auf 10 ml gestellt. Anteile von je 2 ml werden mit 0,1000 N HClO₄ in Eisessig gegen α -Naphtholbenzien titriert. Am Umschlagspunkt trübt sich die Lösung. Gef.: 4,65, 4,70, 4,55 μ Äquiv. NH₂/ml Lösung, entspr. 1 Äquiv. NH₂-Gruppen in 2130 g Substanz.

Bei einem Molekulargewicht von 2000 ergibt sich als wahrscheinliche *mittlere Zusammensetzung* des Kondensats ein Aufbau aus 14 Leucin- sowie 2 säureamidartig und 2 andersartig eingebauten Asparaginsäure-Resten.

Titration mit KOH. 37,4 mg gereinigtes Kondensationsprodukt werden in Isopropylalkohol gelöst, die Lösung auf 5 ml gestellt und Anteile von je 1 ml mit 0,00768 N KOH in Methanol gegen Phenolphthalein titriert. Gef.: 9,13, 8,61 μ Äquiv. COOH/ml Lösung, entspr. 2,53 Äquiv. COOH in 2000 g Substanz.

VII. Ausfärbungen

Mit Helianthin. Färbebad: 200 ml Wasser, 0,05 ml Eisessig, 0,5 g GLAUBER-Salz, 0,1 g Helianthin, 0,50 g Peptidkondensat werden in 20 ml Färbebad von 50° eingetragen; anschliessend wird innert 30 Min. von 50° auf 98° aufgeheizt und 30 Min. auf dieser Temp. gehalten. Man saugt ab und wäscht mit Wasser nach, bis das Filtrat farblos abläuft.

Mit Malachitgrün. Färbebad: 200 ml Wasser, 0,05 ml Eisessig, 0,1 g Malachitgrün. Färbe-
prozess gleich wie bei Helianthin.

ZUSAMMENFASSUNG

L-Leucin-methylester wird mit pulverisiertem Natrium zu einem Produkt kondensiert, dessen wasserunlöslicher Anteil (60–70% d. Th.) zu $\frac{3}{5}$ aus racemischen Leucin-peptiden und zu $\frac{2}{5}$ aus Di-isobutyl-dioxopiperazin besteht. Nach Abtrennung des Leucin-dioxopiperazins durch Vakuumsublimation oder durch Herauswaschen mit starken Mineralsäuren wird ein gereinigtes Polyleucin vom mittleren Kondensationsgrad 10 erhalten.

Bei entsprechenden Kondensationen von DL-Asparaginsäure-dimethylester, von DL-Lysin-methylester und von Gemischen dieser Ester werden in Wasser schwerlösliche Kondensate erhalten, die saure und/oder basische Seitenketten enthalten.

Der wahrscheinliche Reaktionsmechanismus der Natrium-induzierten linearen Kondensation der α -Aminosäureester wird diskutiert.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

267. Recherches sur l'obtention, la séparation et la purification du tantale et du niobium, notamment par voie électrolytique

II. Etude d'une méthode de détermination des tensions effectives d'électrolyse et des tensions pratiques de décomposition; application de cette méthode à des solutions cryolithiques d'oxydes

par R. Monnier et P. Grandjean

(6 X 60)

Introduction. Il est bien connu que la détermination des caractéristiques électrochimiques est beaucoup plus délicate pour les sels fondus que pour les électrolytes aqueux, surtout lorsque les premiers contiennent des fluorures. Cela provient principalement du fait que, par suite de difficultés expérimentales, on ne peut pas mesurer séparément, d'une manière satisfaisante, les potentiels d'électrode qui sont cependant les plus intéressants à connaître dans les études d'électrolyse. On peut obtenir ces potentiels en les déduisant des tensions mesurées aux bornes des cellules d'électrolyse, à la condition de maintenir aussi constantes que possible les conditions à l'électrode opposée à celle de la mesure. Ces valeurs, prises isolément, n'ont d'intérêt que lorsqu'elles sont accompagnées de l'indication des conditions exactes dans lesquelles elles ont été déterminées. Les divergences souvent constatées dans les résultats de divers auteurs sur les mêmes électrolytes sont certainement à attribuer à des différences dans la manière d'opérer. Par contre, en travaillant d'une façon