Mitteilungen aus dem chemischen Institut der Universität
Berlin.

Synthese von Polypeptiden XXXII.

1. Derivate der Asparaginsäure;

von *Emil Fischer* und *Albert Fiedler*.

(Eingelaufen am 11. Juli 1910).

Obschon die Asparaginsäure in den natürlichen Proteinen bei weitem nicht in so großen Mengen wie die Glutaminsäure vorkommt, so ist sie doch als älteste und einfachste Aminodicarbonsäure so wichtig, daß die Kenntnis ihrer Polypeptide für das Studium der Proteine wünschenswert erscheint. Wir haben deshalb die Reaktionen, die bei der Glutaminsäure zum Aufbau des Tetrapeptides Glycylglutamylglycin dienen,¹⁾ auf die Asparaginsäure übertragen und so in der Tat ein Tetrapeptid aus 3 Mol. Glykokoll und 1 Mol. Asparaginsäure erhalten, dem wir nach der Synthese folgenden Namen und Formel geben wollen —

Leider findet beim Übergang von der aktiven Chloracetyl-l-asparaginsäure zu dem Chloracetyl-asparagyl-diglycinäthylester eine Racemisierung statt, welche wahrscheinlich durch die Behandlung der Säure mit Phosphor-pentachlorid veranlaßt wird. Jedenfalls waren der von uns isolierte Ester und alle daraus weiter hergestellten Produkte einschließlich des Tetrapeptids optisch inaktiv.

¹⁾ E. Fischer, W. Kropp und A. Stahlschmidt, diese Annalen 365, 181 (1909).

Nach bekannten Methoden haben wir ferner noch dargestellt l-Leucylglycyl-l-asparaginsäure und l-Leucyl-l-asparaginsäure. Eine Leucylasparaginsäure ist schon früher beschrieben worden.¹⁾ Da sie aber aus l-Asparaginsäureester und optisch inaktivem α -Bromisocapronylchlorid hergestellt wurde, so war sie kein optisch einheitlicher Körper, sondern ein Gemisch der Stereoisomeren, die hier entstehen müssen.

Dieser Schluß wird durch den später angeführten optischen Vergleich des neuen Präparates mit dem alten Produkt bestätigt.

Chloracetyl-l-asparaginsäure,

Zur Darstellung dient entweder Asparaginsäure oder Asparagin. Das Verfahren ist im wesentlichen dasselbe wie bei der Bereitung der Chloracetylglutaminsäure. Wir wollen es hier ausführlich nur für das Asparagin beschreiben, das wegen der Billigkeit für größere Operationen zu bevorzugen ist.

100 g trocknes Asparagin oder 113 g krystallwasserhaltiges Material (1 Mol.) werden mit 758 ccm 3 n-Natronlauge (3 Mol.) in einer Schale etwa $\frac{1}{2}$ Stunde stark gekocht, bis kein Ammoniak mehr entweicht, und mithin die Umwandlung in Asparaginsäure vollzogen ist. Die hierbei ziemlich stark konzentrierte Lösung versetzt man nach dem Abkühlen mit 151 ccm 5 n-Salzsäure, um $\frac{1}{3}$ der ursprünglich angewandten Natronlauge zu neutralisieren. Ihr Volum beträgt dann 400—500 ccm. Man kühlt nun sorgfältig durch Kältemischung und fügt im Laufe von einer Stunde unter starkem Schütteln in etwa sechs Portionen abwechselnd 100 g Chloracetylchlorid (1,2 Mol.) und 760 ccm eiskalte 2 n-Natronlauge (2 Mol.) hinzu. Der Geruch des Säurechlorids verschwindet jedesmal ziemlich rasch. Nach Eintragen der letzten Portion

¹⁾ E. Fischer und E. Königs, Ber. d. d. chem. Ges. **37**, 4593 (1904).

läßt man die Lösung noch etwa eine Stunde in der Kälte stehen. In der Flüssigkeit ist zum Schluß die Chloracetylasparaginsäure als Natriumsalz vorhanden. Um sie in Freiheit zu setzen, bzw. alles Natrium an Chlor zu binden, sind 425 ccm 5n-Salzsäure notwendig. Man setzt aber von dieser Menge nur so viel zu, bis die Flüssigkeit auf Lackmus sauer reagiert, und verdampft dann unter 12—15 mm Druck möglichst rasch auf etwa 300 ccm. Jetzt wird der Rest der Salzsäure zugefügt, abgekühlt und das ausgeschiedene Kochsalz scharf abgesaugt. Die Mutterlauge wird unter gleichem Druck aus einem Bad von etwa 40° ganz zur Trockne verdampft, während das abfiltrierte Kochsalz im Vakuum-exsiccator ebenfalls getrocknet wird. Zur Isolierung der Chloracetylasparaginsäure ist die Extraktion mit heißem Essigäther am meisten zu empfehlen. Sie wird sowohl auf den trocknen Rückstand wie auf das zuerst auskrystallisierte Kochsalz, das immer etwas Chloracetylverbindung einschließt, angewandt. Es ist nötig, vor der Extraktion die Masse zu pulverisieren. Sie wird dann wiederholt mit ungefähr 500 ccm Essigäther 10 Minuten am Rückflußkühler gekocht. Zweckmäßig ist es, das zuerst abgeschiedene Kochsalz getrennt zu behandeln, ferner die essigätherische Lösung jedesmal erst nach dem Abkühlen zu filtrieren und endlich die Auszüge sofort abzudestillieren, um das Destillat für neue Extraktionen zu verwenden. Nach dem Verdampfen des Essigäthers bleibt ein hellgelbes Öl, das sich in der Kälte in einen dicken Brei von Krystallen verwandelt. Die Krystallisation wird durch Impfen sehr beschleunigt. Nach etwa 12 stündigem Stehen wird die Krystallmasse scharf abgesaugt und mit wenig eiskaltem Essigäther nachgewaschen.

Zur Reinigung löst man in etwa 9 Gew.-Thn. Essigäther, entfärbt die schwachgelbe Flüssigkeit mit wenig Tierkohle, und verdampft das Filtrat auf die Hälfte. In der Kälte fällt die Chloracetylasparaginsäure, besonders

nach dem Impfen, als farbloses, krystallinisches Pulver. Die eingeengte Mutterlauge gibt auf Zusatz von Petroläther eine zweite, viel geringere Krystallisation. Die Gesamtausbeute an umkrystallisierter Substanz betrug ungefähr 118 g oder 74 Proz. der Theorie.

Für die Analyse war nochmals aus Essigäther umkrystallisiert und bei 78° unter 12 mm Druck über Phosphorperoxyd getrocknet.

0,2116 g gaben 0,2672 CO₂ und 0,0744 H₂O.

0,1910 g gaben (über 33prozentiger Natronlauge) 10,9 ccm Stickgas bei 17° und 763 mm Druck.

0,1732 g gaben 0,1173 AgCl.

	Ber. für C ₆ H ₈ O ₅ NCl (209,53)	Gef.
C	34,36	34,45
H	3,85	3,93
N	6,69	6,66
Cl	16,92	16,75

Die Substanz schmilzt im Capillarrohr unter Gasentwicklung gegen 142—143° (korr.). Sie löst sich sehr leicht in Wasser und Alkohol. In Äther und namentlich Petroläther ist sie fast gar nicht löslich. Die mit Ammoniak neutralisierte wäßrige Lösung gibt mit Silbernitrat einen farblosen, amorphen Niederschlag, der sich bei dem Erhitzen der Flüssigkeit in erheblicher Menge löst.

0,8009 g Substanz. Gesamtgewicht der wäßrigen Lösung 7,9543 g. $d_{19}^{19} = 1,0367$. Drehung im 2 dm-Rohr bei 19° und Natriumlicht 0,87° nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{19} = 4,17^{\circ} (\pm 0,2).$$

0,5116 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 5,0875 g. $d_{19}^{19} = 1,0384$. Drehung im 1 dm-Rohr bei 19° und Natriumlicht 0,44° ($\pm 0,02$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{19} = + 4,21 (\pm 0,2).$$

Zum Beweis, daß die Substanz keine wesentliche Menge von Racemkörper enthielt, haben wir sie durch Salzsäure hydrolysiert und das Drehungsvermögen der hierdurch entstehenden Lösung bestimmt.

1 g Chloracetyl-asparaginsäure (entsprechend 0,6363 g Asparaginsäure) wurde mit 5 ccm 20prozentiger Salzsäure 5 Stunden auf 100° im geschlossenen Rohr erhitzt. Die Drehung der Lösung war dann im 1-dm-Rohr 2,9° nach rechts, $d^{19} = 1,101$, während eine Lösung von 0,6363 g reiner l-Asparaginsäure in 5 ccm 20 prozentiger Salzsäure mit $d^{19} = 1,118$ den Wert 3,09° gab.

Glycyl-l-asparaginsäure,

Wird eine Lösung von 10 g Chloracetylverbindung in 50 ccm wäßrigem Ammoniak von 25 Proz. 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so ist die Abspaltung des Halogens beendet. Zur Isolierung des Dipeptids müssen Halogen und Ammoniak völlig entfernt werden. Zu dem Zweck fügt man eine warme Lösung von 30 g krystallisiertem Bariumhydroxyd zu und verdampft unter 12—15 mm Druck auf etwa die Hälfte, bis alles Ammoniak verschwunden ist. Zur Entfernung des Chlors wird jetzt auf bekannte Weise mit Schwefelsäure und Silbersulfat gefällt und die völlig von Chlor, Silber, Barium und Schwefelsäure befreite Flüssigkeit unter geringem Druck eingedampft. Wird der zurückbleibende Sirup in einer Platinschale einigemal unter Umrühren mit absolutem Alkohol verdampft, so verwandelt er sich in eine feste amorphe Masse. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt ungefähr 80 Proz. der Theorie.

Um daraus Krystalle zu gewinnen, löst man in Wasser und fügt Alkohol bis zur Trübung zu. Bei mehrtägigem Stehen beginnt in der Regel die Krystallisation. In dem Maße, wie sie fortschreitet, fügt man in gelinder Wärme (35—40°) mehr Alkohol, immer bis zur Trübung, zu. Durch Impfen wird die Operation beschleunigt, immerhin kann sie bei größeren Mengen etwa 2 Wochen dauern. Zur völligen Reinigung genügt es, die abgesaugten Krystalle nochmals in der 5 fachen Menge Wasser zu lösen, mit wenig Tierkohle zu erhitzen und das warme

Filtrat wiederum mit Alkohol bis zur Trübung zu versetzen. Beim Impfen geht jetzt die Krystallisation so rasch vonstatten, daß sie in 24 Stunden beendet sein kann. Die Ausbeute an reinem, zweimal krystallisiertem Dipeptid betrug 65 Proz. d. Th. Das krystallinische Pulver zeigte unter dem Mikroskop keine charakteristische Form.

Wenn das Dipeptid aus verdünnter Lösung krystallisiert ist, so enthält es in der Regel 1 Mol. Wasser, das bei 105° und 12 mm Druck über Phosphorpentoxyd rasch weggeht.

0,1936 g über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet, verloren bei 105° unter 12 mm Druck 0,0170 g.

0,2002 g verloren 0,0174 g.

Ber. für $C_6H_{10}N_2O_5 \cdot H_2O$ (208,1)		Gef.
H_2O	8,65	8,78 8,69

Das trockne Dipeptid gab folgende Zahlen:

0,1828 g gaben 0,2531 CO_2 und 0,0883 H_2O .

0,2020 g „ nach Kjeldahl 21 cem $\frac{1}{10}$ - NH_3 .

Ber. für $C_6H_{10}N_2O_5$ (190,1)		Gef.
C	37,87	37,76
H	5,30	5,40
N	14,74	14,56

Aus konzentrierten Lösungen haben wir einigemal Präparate erhalten, die viel weniger Wasser (2 Proz.) enthalten, und die wohl ein Gemisch von wasserhaltiger und wasserfreier Substanz waren.

Für die optische Bestimmung diente ebenfalls ein bei 105° getrocknetes und vorher mehrmals umkrystallisiertes Präparat.

0,2730 g Substanz, gelöst in Wasser. Gesamtgewicht 2,7903 g.
 $d^{20} = 1,044$. Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1,13° ($\pm 0,01$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 11,06^\circ (\pm 0,1).$$

0,6254 g nochmals umkrystallisierte Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 6,7880. $d^{20} = 1,0404$. Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1,06° ($\pm 0,01$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 11,1^\circ (\pm 0,1).$$

Das getrocknete Dipeptid schmilzt bei raschem Erhitzen im Capillarrohr gegen 203° (korr. 207°) unter starker Gasentwicklung und Gelbfärbung.

Es ist in Wasser leicht löslich und reagiert stark sauer. In kaltem Alkohol ist es fast unlöslich. Die mit Ammoniak neutralisierte wäßrige Lösung gibt mit Silbernitrat einen dicken, amorphen, farblosen Niederschlag, der sich beim Erwärmen der Flüssigkeit in erheblicher Menge löst. Das Dipeptid löst Kupferoxyd beim Kochen mit tiefblauer Farbe.

d- α -Bromisocapronyl-glycyl-l-asparaginsäure,

In eine Lösung von 10 g Glycyl-l-asparaginsäure (1 Mol.) und 105,5 ccm n-Natronlauge (2 Mol.), die durch eine Kältemischung gekühlt ist, trägt man unter starkem Schütteln in sechs Portionen und abwechselnd 13,5 g (1,2 Mol.) d- α -Bromisocapronylchlorid (aus d-Leucin) und 105,5 ccm gekühlte n-Natronlauge im Laufe von etwa 2 Stunden ein. Nach weiterem einstündigem Stehen wird mit 29,5 ccm 5n-Salzsäure (2,8 Mol.) angesäuert. Es ist dabei zweckmäßig, zunächst nur einen Teil der Säure bis zur dauernden Trübung zuzusetzen und jetzt einige Kryställchen einzutragen, um sofort die Krystallisation einzuleiten. Fügt man dann allmählich den übrigen Teil der Salzsäure zu, so erreicht man, daß der Bromkörper gar nicht als Öl, sondern völlig krystallisiert ausfällt. Die ersten Krystalle muß man sich allerdings auf mühsamerem Wege, durch Extraktion des Öls mit Äther, Trocknen und Verdampfen der Lösung und längeres Stehen des Rückstandes im Vakuumexsiccator bereiten.

Wenn die wäßrige Flüssigkeit nach Zusatz der gesamten Salzsäure 12 Stunden im Eisschrank gestanden hat, werden die Krystalle scharf abgesaugt, im Vakuumexsiccator getrocknet und mit Petroläther gewaschen, um kleine Mengen von Bromisocaprone Säure zu entfernen. Die Ausbeute beträgt etwa 12,5 g. Eine kleine Menge

(etwa 1 g) desselben Produktes läßt sich aus der sauren Mutterlauge gewinnen, indem man sie unter sehr geringem Druck einengt und das abgeschiedene Öl ausäthert, dann den Äther trocknet, verdampft und den Rückstand durch längeres Stehen und Zusatz von Petroläther zur Krystallisation bringt.

Zur Reinigung wird die Substanz in etwa 5 Tln. heißen Wassers gelöst, mit wenig Tierkohle entfärbt und das Filtrat auf 0° abgekühlt. Sie fällt dann fast vollständig in kurzen Prismen aus. An diesem reinen Produkt wurden im ganzen 13 g aus 10 g Dipeptid gewonnen.

Die Krystalle enthalten Wasser. Für die lufttrockne Substanz fanden wir seine Menge entsprechend ungefähr $\frac{1}{2}$ Mol. Im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure geht es bei zwölfstündigem Stehen nicht weg, wohl aber bei mehrstündigem Trocknen unter 15 mm Druck über Phosphoroxoxyd bei 78°.

0,2592 g (über Schwefelsäure getrocknet) verloren 0,0061 g.

0,2299 g verloren 0,0051 g.

Ber. für $C_{12}H_{19}O_6N_2Br + \frac{1}{2} H_2O$ (376,1)	Gef.
H_2O 2,39	2,35 2,22

Die trockne Substanz gab folgende Zahlen:

0,1607 g gaben 0,2305 CO_2 und 0,0758 H_2O .

0,1594 g „ 10,3 ccm Stickgas bei 18° und 766 mm Druck
über 33prozentiger Natronlauge.

0,1577 g gaben 0,0815 AgBr.

Ber. für $C_{12}H_{19}O_6N_2Br$ (367,09)	Gef.
C 39,23	39,12
H 5,22	5,28
Br 21,77	21,98
N 7,64	7,55

Der trockne Körper ist hygroskopisch. Die im Exsiccator getrocknete Substanz schmilzt im Capillarrohr bei 118—119° (119—120° korr.). Er löst sich in ungefähr 4 Tln. heißem Wasser, auch leicht in Alkohol, dagegen schwer in Äther und Benzol.

Für die optische Bestimmung diente eine alkoholische Lösung.

0,6472 g getrocknete Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 5,6656 g. $d_{21}^{21} = 0,8374$. Drehung im 1 dm-Rohr bei 21° und Natriumlicht $5,88^{\circ} (\pm 0,02)$ nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{21} = + 61,5^{\circ} (\pm 0,2).$$

0,4048 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 4,0501 g. $d_{21}^{21} = 0,8328$. Drehung im 1 dm-Rohr bei 21° und Natriumlicht $5,09^{\circ} (\pm 0,02)$ nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{21} = + 61,2^{\circ} (\pm 0,2).$$

l-Leucylglycyl-l-asparaginsäure,

Die Darstellung aus dem Bromkörper geschah genau so, wie bei der Glycyl-l-asparaginsäure beschrieben ist. Bei dem schließlichen Verdampfen der wäßrigen Lösung bleibt ein Sirup zurück. Er wird mit wenig Wasser in eine Platinschale gespült, auf dem Wasserbad wieder eingedampft und durch Verreiben mit absolutem Alkohol in eine amorphe Masse verwandelt. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen betrug seine Menge 75 Proz. d. Th. Um das Produkt krystallinisch zu erhalten, löst man 2 g in einer Platinschale in wenig warmem Wasser, fügt 60 ccm Alkohol zu und verdampft unter Umrühren auf dem Wasserbad. Diese Operation muß fünf- bis sechsmal wiederholt werden, bis in der Hitze die Abscheidung von Krystallen beginnt, und bei dem Erkalten die Lösung keine Gallerte mehr abscheidet. Läßt man dann die auf etwa 30 ccm eingeeengte Flüssigkeit langsam erkalten, so fällt das Tripeptid in mikroskopisch kleinen, farblosen Nadeln aus. Sie werden abgesaugt, in wenig Wasser gelöst und die Flüssigkeit bei 50° mit Aceton bis zur dauernden Trübung versetzt. Beim langsamen Abkühlen fällt das reine Tripeptid in feinen Nadeln aus. Seine Menge betrug ungefähr $\frac{2}{3}$ des amorphen Rohprodukts.

Für die Analyse und optische Untersuchung wurde bei 105° und 12—15 mm Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1315 g gaben 0,2283 CO_2 und 0,0836 H_2O .

0,2061 g „ 20,1 ccm $\frac{n}{10}\text{-NH}_3$.

	Ber. für $C_{12}H_{21}O_6N_3$ (303,2)	Gef.
C	47,49	47,35
H	6,98	7,11
N	13,86	13,65

0,0740 g Substanz. Gesamtgewicht der wäßrigen Lösung 1,4390 g. $d^{20} = 1,017$. Drehung im 1 dem-Rohr bei 20° und Natriumlicht $2,89^\circ (\pm 0,02)$ nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 55,25^\circ [\pm 0,2].$$

0,1709 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 3,2411 g. $d^{20} = 1,018$. Drehung im 1 dem-Rohr bei 20° und Natriumlicht $2,95^\circ (\pm 0,02)$ nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 54,96^\circ [\pm 0,2].$$

Bei raschem Erhitzen im Capillarrohr schmilzt das Tripeptid gegen 233° (corr. 239°) unter Zersetzung nach vorhergehender Bräunung.

Es löst sich in Wasser sehr leicht und reagiert sauer. In absolutem Alkohol und Aceton ist es sehr wenig löslich.

Chloracetyl-asparagyl-diglycyläthylester,

10 g sorgfältig getrocknete und sehr fein gepulverte Chloracetylasparginsäure werden mit 50 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid in einem mit Glasstopfen versehenen Schüttelzylinder übergossen, auf etwa 5° abgekühlt und dann 22 g (2,2 Mol.) rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid in drei Portionen unter Schütteln und im Laufe von 15 Minuten eingetragen. Hierbei findet fast vollständige Lösung der Chloracetylasparginsäure statt. Man schüttelt jetzt noch 15 Minuten bei Zimmertemperatur, kühlt dann auf 0° ab und filtriert vom unverbrauchten Phosphorpentachlorid in dieselbe Flasche, in der nachher die Filtration vorgenommen wird. Wird jetzt das Acetylchlorid unter möglichst geringem Druck verdampft, so scheidet sich in der Regel das Säurechlorid als dicke, aber nicht deutlich

krystallinische Masse ab. Man verdünnt mit 150 ccm scharf getrocknetem Petroläther, um die Abscheidung des Chlorids zu vervollständigen und filtriert die Masse sofort mit einem Pukallschen Tonfilter unter Benutzung des für diesen Zweck früher empfohlenen Apparats.¹⁾

Nachdem noch zweimal mit je 50 ccm trockenem Petroläther nachgewaschen ist, wird das Produkt im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet und bildet dann ein farbloses, lockeres Pulver. Die Ausbeute betrug gewöhnlich 6,2 g oder 52 Proz. d. Th.

Wenn beim Abdestillieren des Acetylchlorids das Säurechlorid sich nicht ausscheidet, so wird die auf etwa 20 ccm eingeeengte Flüssigkeit allmählich und unter Reiben mit etwa 200 ccm Petroläther verdünnt, wobei die Abscheidung eintritt.

Das so gewonnene Chlorid ist keineswegs rein. Eine Chlorbestimmung ergab nur 24,1 Proz., während 28,8 Proz. berechnet sind. Trotzdem haben wir es direkt für die Kuppelung mit Glykokollester benutzt. Zu dem Zweck wurden 6 g Rohprodukt mit 50 ccm ganz trockenem Äther übergossen. Dabei geht das Chlorid in Lösung. Man gießt die ätherische Lösung von dem Rückstand ab, der zum Teil aus Chloracetylasparaginsäure besteht und spült mit 50 ccm Äther nach. Diese Lösung wird sofort zu einer durch Eis gekühlten Mischung von 15 g frisch destilliertem Glykokollester und 50 ccm trockenem Äther unter Schütteln zugetropft. Der hierbei sofort entstehende Niederschlag ist ein Gemisch von salzsaurem Glykokollester und Chloracetylasparagindiglycinester. Er wird abgesaugt, mit Äther gewaschen, nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator zur Entfernung des salzsauren Glykokollesters mit wenig eiskaltem Wasser verrieben, abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen.

Die Ausbeute an rohem Chloracetylasparagylidiglycinäthylester betrug 6,9 g. Zur Reinigung wird das Pro-

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 38, 616 (1905).

dukt in der 20fachen Gewichtsmenge heißem Essigäther gelöst und mit wenig Tierkohle entfärbt. Aus dem Filtrat scheidet sich in der Kälte der reine Chloracetyl-asparagylidglycinerester in farblosen, sehr dünnen biegsamen Nadeln aus. Die Ausbeute betrug nur 4,3 g oder 24 Proz. d. Th., berechnet auf die angewandte Chloracetyl-asparaginsäure. Aus der Essigäther-Mutterlauge gewinnt man durch Einengen noch eine kleine Menge (0,2 g). Beim völligen Verdampfen hinterläßt sie ein dickes Öl.

Zur Analyse wurde nochmals aus heißem Essigäther umgelöst und unter 15 mm Druck bei 78° getrocknet.

0,1568 g gaben 0,2532 CO₂ und 0,0806 H₂O.

0,2909 g „ 0,1120 AgCl.

0,2009 g „ 19,8 ccm Stickgas bei 16° und 745 mm Druck
(über 33prozentiger Natronlauge).

Ber. für C ₁₄ H ₂₂ O ₇ N ₃ Cl (379,66)		Gef.
C	44,25	44,04
H	5,84	5,75
Cl	9,34	9,52
N	11,07	11,28

Die Substanz schmilzt im Capillarrohr bei 173 bis 174° (korr. 176—177°) nach vorhergehender Sinterung. In warmem Wasser ist sie ziemlich leicht löslich. Von heißem Essigäther sind ungefähr 17 ccm für 1 g nötig, in Äther ist sie sehr schwer löslich.

Die 5prozentige wässrige Lösung zeigte im 1-cm-Rohr keine wahrnehmbare Drehung. Ebenso inaktiv blieb die Lösung von 1 g des Esters in 5 ccm 20 prozentiger Salzsäure, nachdem sie 5 Stunden auf 100° erhitzt war. Da hierbei Asparaginsäure entsteht, die in Salzsäure stark dreht, so beweist der Versuch, daß der Ester vollständig racemisiert ist. Wir glauben, daß diese Racemisierung vorzugsweise bei der Verwandlung der Chloracetyl-asparaginsäure ins Chlorid vor sich geht.

Werden 5 g fein gepulverter Ester mit 30 ccm n-Natronlauge (2,2 Mol.) bei gewöhnlicher Temperatur auf der Maschine geschüttelt, so geht er im Laufe von etwa 2 Stunden völlig in Lösung. Man läßt noch $\frac{1}{2}$ Stunde stehen, versetzt dann mit 6 ccm 5n-Salzsäure und filtriert die etwas trübe Flüssigkeit schnell. In dem Filtrat beginnt besonders beim Reiben bald die Krystallisation des Chloracetyl-asparagyldiglycins in mikroskopischen farblosen Nadeln oder sehr dünnen Prismen. Nach zweistündigem Stehen bei 0° wird filtriert. Die Ausbeute betrug 3,6 g und die eingeeengte Mutterlauge gab noch weiter 0,4 g. Die gesamte Ausbeute entsprach also 95 Proz. d. Th.

Zur Reinigung wird aus etwa 7 Tln. heißem Wasser umkrystallisiert. Für die Analyse diente ein zweimal umgelöstes Präparat. Die lufttrocknen Krystalle enthalten 1 Mol. Wasser, das schon im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure weggeht.

0,4695 g verloren 0,0255 H₂O.

0,3318 g „ 0,0177 H₂O.

Ber. für C₁₀H₁₄O₇N₃Cl.H₂O (341,6)

Gef.

H₂O

5,28

5,44 5,33

Zur Analyse wurde noch bei 78° über Phosphor-pentoxyd bei 12—15 mm Druck getrocknet.

0,1586 g gaben 0,2154 CO₂ und 0,0614 H₂O.

0,2447 g „ 0,1077 AgCl.

0,1510 g „ 16,8 ccm Stickgas bei 15° und 745 mm Druck
(über 33prozentiger Natronlauge).

Ber. für C₁₀H₁₄O₇N₃Cl (323,06)

Gef.

C

37,08

37,04

H

4,36

4,33

Cl

10,96

10,89

N

12,99

12,80

Die im Vakuumexsiccator getrocknete Verbindung schmilzt nicht ganz konstant im Capillarrohr gegen

140—141° (142—143° korr.) unter Schäumen. Sie löst sich in 6—7 Tln. heißem Wasser, aber schwer in kaltem Wasser. In Alkohol ziemlich leicht löslich, in Essigäther und Äther recht schwer löslich. Sie reagiert stark sauer. Die mit Ammoniak neutralisierte wäßrige Lösung gibt mit Silbernitrat einen dicken, farblosen, nicht deutlich krystallisierten Niederschlag.

Eine Lösung von 5 g Chloracetylasparagyl diglycin in 25 ccm Ammoniak von 25 Proz. wird 5 Tage bei 25° aufbewahrt. Dann werden Ammoniak, Halogen usw. in der für Glycylasparaginsäure beschriebenen Weise entfernt. Es ist dabei ratsam, das Verdampfen immer bei möglichst geringem Druck vorzunehmen. Schließlich wird die mit Tierkohle entfärbte wäßrige Lösung, nachdem sie auf etwa 50 ccm eingeeengt ist, im Vakuumexsiccator zum dünnen Sirup verdunstet und mit wenig Aceton verrieben. Nach längerer Zeit pflegt dann das Tetrapeptid zu krystallisieren. Impfen befördert den Vorgang. Nach Beginn der Krystallisation läßt man noch 3 Tage im Eisschrank stehen, saugt dann die Krystalle ab und wäscht mit sehr wenig eiskaltem Wasser. Bei gut gelungener Operation war die Ausbeute 60 Proz. der Theorie.

Zur Reinigung löst man in etwa der 10 fachen Menge Wasser, filtriert und verdunstet das Filtrat wiederum im Exsiccator. Das Tetrapeptid scheidet sich dann in mikroskopisch feinen, farblosen Nadelchen ab, die meist zu größeren Klumpen verwachsen sind. Die im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknete Substanz enthielt noch etwas Wasser und wurde deshalb unter 15 mm Druck bei 125° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1774 g gaben 0,2551 CO₂ und 0,0860 H₂O.

0,1815 g „ 28,7 ccm Stickgas bei 19° und 766 mm Druck
(über 33 prozentiger Natronlauge).

	Ber. für $C_{10}H_{16}O_7N_4$ (304,17)	Gef.
C	39,45	39,23
H	5,30	5,43
N	18,42	18,39

Die im Exsiccator getrocknete Substanz schmilzt bei raschem Erhitzen im Capillarrohr nach vorhergehender Sinterung und Gelbfärbung gegen $197-199^{\circ}$ (korr. $201-203^{\circ}$). Das Tetrapeptid ist in Wasser, besonders in der Wärme, recht leicht löslich, dagegen in Alkohol und Aceton äußerst schwer löslich. Es reagiert und schmeckt sauer. Die mit Ammoniak neutralisierte wäßrige Lösung gibt mit Silbernitrat einen dicken, farblosen, amorphen Niederschlag, der sich beim Erhitzen der Flüssigkeit ziemlich leicht löst.

Die alkalische Lösung des Tetrapeptids gibt mit nicht zuviel Kupfersulfat eine schön rotviolette Färbung, die bei mehr Kupfersalz in Bläulichviolett übergeht.

Die wäßrige Lösung des Tetrapeptids färbt sich beim Kochen mit Kupferoxyd tiefblau. Dabei scheint aber, zumal wenn man länger kocht, Hydrolyse einzutreten.

Die Kuppelung wurde mit 10 g Asparaginsäure und 19,2 g (1,2 Mol.) *d-α*-Bromisocapronylchlorid in derselben Weise ausgeführt, wie es zuvor bei der Glycylasparaginsäure beschrieben ist. Das Kuppelungsprodukt fällt beim 24 stündigen Stehen der angesäuerten Flüssigkeit zum größten Teil (14 g) in feinen Nadeln aus, die fast immer zu kugeligen Aggregaten verwachsen sind. Aus der Mutterlauge wurde durch Einengen unter vermindertem Druck und Extraktion mit Äther noch 2,5 g gewonnen. Die Gesamtausbeute betrug also 16,5 g, oder, auf Asparaginsäure berechnet, 70 Proz. der Theorie.

Zur Reinigung wurde zunächst in warmem Äther gelöst und mit Petroläther gefällt, und die so erhaltene Masse nochmals aus 5 Tln. heißem Wasser umkrystallisiert,

wobei es nötig war, zuletzt auf 0° abzukühlen und die Mutterlauge noch besonders zu verarbeiten. Die Ausbeute an reiner Säure betrug 14 g.

Zur Analyse war im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

0,1826 g gaben 0,2590 CO_2 und 0,0839 H_2O .

0,2023 g „ 0,1232 AgBr.

0,3068 g „ 9,5 ccm $\frac{n}{10}$ - NH_3 .

	Ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{NBr}$ (310,06)	Gef.
C	38,70	38,68
H	5,20	5,14
Br	25,78	25,92
N	4,51	4,34

Die Substanz schmilzt im Capillarrohr gegen 148° (korr. 150°). Sie ist nicht allein in heißem Wasser, sondern auch in Alkohol und Aceton recht leicht löslich. Auch von Äther und Essigäther wird sie in der Wärme reichlich aufgenommen. In Wasser von 20° ist sie schon so schwer löslich, daß eine in der Wärme bereitete 9prozentige Lösung beim längeren Stehen Krystalle abscheidet.

Für die optische Bestimmung diente deshalb eine ziemlich verdünnte wäßrige Lösung.

0,4481 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 10,9536 g.
 $d_{20}^{22} = 1,013$. Drehung im 1 dem-Rohr bei 22° und Natriumlicht $0,34^{\circ}$ ($\pm 0,02$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{22} = + 8,21^{\circ} (\pm 0,2).$$

0,3186 g Substanz. Gesamtgewicht 6,6241 g. $d_{20}^{22} = 1,014$.
 Drehung im 1 dem-Rohr bei 22° und Natriumlicht $0,39^{\circ}$ ($\pm 0,02$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{22} = + 8,00^{\circ} (\pm 0,2).$$

Im ganzen gleicht die Substanz sehr dem unter gleichem Namen von E. Fischer und E. Königs beschriebenen Körper¹⁾, der aber nach der Darstellung aus inaktiver α -Bromisocaprinsäure ein Gemisch von zwei Stereoisomeren sein mußte. Eine mit dem alten Präparate

¹⁾ a. a. O.

von Dr. Königs ausgeführte optische Bestimmung bestätigt diesen Schluß; denn es drehte unter den oben angegebenen Bedingungen nach links, und zwar

$$[\alpha]_D = -9,7^\circ.$$

l-Leucyl-l-asparaginsäure,

Für Darstellung und Isolierung gilt wieder die vorher für Glycylasparaginsäure gegebene Vorschrift. Nur muß die ammoniakalische Lösung des Bromkörpers bei Zimmertemperatur etwa 6 Tage stehen, bis alles Halogen abgespalten ist. Beim Verdampfen der letzten wäßrigen Lösung bleibt das Dipeptid als Sirup, der aber beim Verreiben mit absolutem Alkohol bald zu einer amorphen, farblosen Masse erstarrt. Ausbeute etwa 75 Proz. der Theorie.

Zur Reinigung wird das Produkt in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle in der Wärme entfärbt und das Filtrat im Exsiccator verdunstet, wobei das Dipeptid in feinen, farblosen Nadeln ausfällt. Die Ausbeute betrug ungefähr 55 Proz. der Theorie.

Die Krystalle enthalten Wasser. Für die lufttrockne Substanz fanden wir seine Menge entsprechend 2 Mol. Im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd und unter 12 mm Druck verliert es bei 24 stündigem Stehen das Wasser.

0,3474 g verloren 0,0443 H₂O.

0,4539 g „ 0,0572 H₂O.

Ber. für C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅ · 2 H ₂ O (282,19)	Gef.
H ₂ O 12,77	12,75 12,61

Zur Analyse und optischen Bestimmung war die im Vakuumexsiccator getrocknete Substanz nochmals über Phosphorpentoxyd unter 15 mm Druck bei 105° getrocknet

0,3518 g gaben 0,6299 CO₂ und 0,2268 H₂O.

0,2451 g „ 20,2 ccm $\frac{n}{10}$ -NH₃.

	Ber. für $C_{10}H_{18}O_5N_2$ (246,16)	Gef.
C	48,75	48,83
H	7,37	7,22
N	11,38	11,54

Die wasserfreie Substanz schmilzt gegen 179° (korr. 182°) unter Gasentwicklung. Die trockne Substanz ist hygroskopisch.

0,3952 g Substanz. Gesamtgewicht der wäßrigen Lösung 6,3577 g. $d^{18} = 1,017$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 18° und Natriumlicht $1,71^{\circ}$ ($\pm 0,02$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{18} = + 27,05^{\circ} (\pm 0,4).$$

0,3016 g Substanz. Gesamtgewicht 5,7722 g. $d^{18} = 1,015$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 18° und Natriumlicht $1,42^{\circ}$ ($\pm 0,02$) nach rechts. Mithin

$$[\alpha]_D^{18} = + 26,80^{\circ} (\pm 0,4).$$

Das früher als Leucylasparaginsäure¹⁾ beschriebene Präparat war entsprechend der Darstellung aus inaktiver Bromisocaproonsäure noch ein Gemisch von Stereoisomeren. Infolgedessen weichen seine Eigenschaften etwas von den obigen Beobachtungen ab. Das gilt z. B. vom Krystallwasser, das früher nur 1 Mol. betrug, ferner vom optischen Verhalten, das früher nicht geprüft wurde. Herr Dr. Königs hat aber jetzt das Präparat nochmals nach dem alten Verfahren dargestellt und das Drehungsvermögen ganz anders, d. h. $[\alpha]_D = - 4,6$, gefunden.

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges. **37**, 4593 (1904).