

2.2210 g Sbst. verloren bei 78° und 0.5 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.1667 g an Gewicht. — 5.740 mg getrocknet. Sbst. hinterließen 0.003 mg Asche. 4.455 mg getrocknet. Sbst.: 6.325 mg CO<sub>2</sub>, 2.858 mg H<sub>2</sub>O. — 5.162 mg Sbst.: 7.355 mg CO<sub>2</sub>, 3.255 mg H<sub>2</sub>O. — 1.950 mg Sbst.: 0.408 ccm N (20°, 738 mm, nach Pregl). — 2.050 mg Sbst.: 0.428 ccm N (19°, 740 mm). — 0.1511 g Sbst.: 0.0688 g BaSO<sub>4</sub>. — 0.1485 g Sbst.: 0.0674 g BaSO<sub>4</sub>. — 0.1866 g Sbst.: 0.0852 g BaSO<sub>4</sub>.

Gef. C 38.72, H 7.18, N 23.67, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 19.13.

„ 38.86, „ 7.06, „ 23.76, „ 19.07, 19.18.

Kossel gab folgende Mittelwerte an<sup>10)</sup>:

C 37.85, H 6.76, N 25.03, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 21.01.

Kossel teilt nichts über den Asche-Gehalt seiner Präparate mit. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann fanden a. a. O. für ein getrocknetes Clupein-Sulfat, das 2.37% Asche enthielt, 23.56% N und 20.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Unser getrocknetes Präparat zeigte  $[\alpha]_D^{18} = -83,5^{\circ}$  in 1-proz. wäßriger Lösung in guter Übereinstimmung mit den Angaben Kossels.

0.0731 g getr. Clupein-Sulfat wurden zur Untersuchung der Autoracemisation in 2.80 ccm *n*/<sub>10</sub>-Natronlauge (statt 2.83 ccm) gelöst und bei 20° aufbewahrt. Die Lösung folgenden Verlauf des Drehungsabfalls:

Zeit in Stdn.:	0	1	2	5	21	68	140	210
Gef. im 2-dm-Rohr:	—3.75°	—3.62°	—3.55°	—3.43°	—3.03°	—2.42°	—1.88°	—1.60°

### 305. Max Bergmann, Leonidas Zervas und Vincent du Vigneaud<sup>1)</sup>: Synthese arginin-haltiger Peptide: *d*-Tyrosyl-*d*-arginin und sein Anhydrid<sup>2)</sup>.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Leder-Forschung, Dresden.]

(Eingegangen am 8. Juni 1929.)

Wir setzen in dieser Arbeit unsere Bemühungen um die Kenntnis arginin-haltiger Peptide fort. Da in vielen Proteinen und protein-verwandten Stoffen sowohl Arginin wie Tyrosin vorkommen, haben wir ein Tyrosyl-arginin und sein Anhydrid synthetisiert. Die Synthese verläuft in mehreren Stufen. Das Azlacton (I) der  $\alpha$ -Acetamino-*p*-acetoxy-zimtsäure haben wir mit Arginin (II) gekuppelt und das erhaltene acetylierte, ungesättigte Peptid III katalytisch hydriert. Von den Hydrierungsprodukten der Struktur IV haben wir das Diacetat des *d*-Tyrosyl-*d*-arginins krystallisiert erhalten. Es lieferte bei der Abspaltung der Acetylcgruppe das freie *d*-Tyrosyl-*d*-arginin (V), das wir mit Hilfe seiner schwerlöslichen Verbindung mit Salicylaldehyd von den Nebenprodukten der Hydrolyse abtrennen konnten.

*d*-Tyrosyl-*d*-arginin zeigt als salzsaures Salz beträchtliche Linksdrehung. Das Phosphorwolframat ist erwartungsgemäß schwer löslich.

Aus dem Dipeptid wurde über das Ester-Chlorhydrat das *d*-Tyrosyl-*d*-arginin-anhydrid (VI) gewonnen. Das freie Anhydrid ist in Wasser recht schwer löslich. Das salzsaure Salz ist linksdrehend, wenn auch erheblich

<sup>10)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **25**, 168 [1898].

<sup>1)</sup> Fellow National Research Council.

<sup>2)</sup> 28. Mitteilung über Umlagerungen peptid-ähnlicher Stoffe.



zur Trockne verdampft, der amorphe Rückstand in 50 ccm Eisessig gelöst und in Gegenwart von Palladiumschwarz hydriert (770 ccm Wasserstoff bei 22°, 748 mm). Bei Anwendung eines frisch hergestellten Katalysators war in der Regel die Wasserstoff-Aufnahme nach 6 Stdn. beendet. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung hinterließ beim Verdampfen einen Sirup, der beim wiederholten Lösen in Wasser und Wiederverdampfen krystallinisch erstarrte. Die mit kaltem absol. Alkohol (im ganzen 90 ccm) aufs Filter gebrachten Krystalle (8 g) bestanden zum größten Teil aus dem essigsauren Salz des Diacetyl-*d*-tyrosyl-*d*-arginins, dem vermutlich erhebliche Mengen der isomeren *l*-*d*-Verbindung beigemischt waren.

Zur Analyse wurde mehrmals in wenig pyridin-haltigem Wasser gelöst und durch Zusatz von Essigsäure wieder abgeschieden, bis das Drehungsvermögen konstant war. Das Präparat bildete dann kurze Nadelchen vom Schmp. 196° (korr.). Es wurde für die folgenden Bestimmungen bei 78° und 0.2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet. Es enthielt dann noch 1 Mol. Essigsäure.

0.1215 g Sbst.: 0.2333 g CO<sub>2</sub>, 0.0717 g H<sub>2</sub>O. — 3.530 mg Sbst.: 0.457 ccm N (20°, 740 mm, nach Pregl).

C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>.COOH (481.3). Ber. C 52.36, H 6.49, N 14.55.

Gef. „ 52.37, „ 6.60, „ 14.69.

$[\alpha]_D^{21} = -1.23^{\circ} \times 3.5015/2 \times 1.0014 \times 0.1101 = -19.5^{\circ}$  (in Wasser).

Bei der Hydrolyse mit 20-proz. Salzsäure wurde *d*-Tyrosin von  $[\alpha]_D^{21} = +9.5^{\circ}$  (in 4-proz. Salzsäure) erhalten. In der Literatur sind für optisch reine Tyrosine Werte von 10° bis 12° angegeben für die Untersuchung in Salzsäure derselben Konzentration.

#### *d*-Tyrosyl-*d*-arginin (V).

Bei der Abspaltung der Acetyle aus dem acetylierten Peptid mittels Salzsäure entstehen eine Reihe von Nebenprodukten, von welchen wir das Peptid durch Überführung in die Salicyliden-Verbindung abtrennen konnten.

Salicyliden-*d*-tyrosyl-*d*-arginin: 9 g einmal umkrystallisiertes Acetyl-dipeptid wurden mit 180 ccm *n*-Salzsäure 35 Min. im Bad von 130° gekocht, dann bei niedrigerer Temperatur unter geringem Druck verdampft, in 10 ccm Wasser gelöst und unter Kühlung mit 2-*n*. Natronlauge unter Anwendung von Lackmus als Indicator neutralisiert. Jetzt wurden noch 10 ccm *n*-NaOH (etwas mehr als 1/2 Mol.) und 2.3 ccm Salicylaldehyd (1 Mol.) zugegeben und unter häufigem Schütteln 12 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Die abgeschiedenen gelben Nadeln wurden abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Exsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute 5.4 g vom Zers.-Pkt. 181—183° (korr.). Löst man die Substanz in heißem Methanol, so scheiden sich bald sechseckige Blättchen ab, die nun bei 252 bis 254° (korr.) schmelzen.

2.965 mg Sbst. (bei 56°, 0.2 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getr.): 6.495 mg CO<sub>2</sub>, 1.620 mg H<sub>2</sub>O. — 3.580 mg Sbst. (bei 56°, 0.2 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getr.): 0.487 ccm N (22°, 759 mm).

C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub> (441.3). Ber. C 59.82, H 6.17, N 15.87.

Gef. „ 59.74, „ 6.11, „ 15.72.

Die Salicyliden-Verbindung existiert in zwei Formen von verschiedenem Schmelzpunkt und verschiedener Farbe<sup>7)</sup>. Löst man diese hochschmelzende

<sup>7)</sup> Über einen ähnlichen Fall vergl. M. Bergmann und H. Köster, Ztschr. physiol. Chem. 167, 108 [1927].

Form in heißem wasser-haltigem Methanol (ca. 80%) und versetzt dann mit viel Wasser, so scheiden sich in sehr guter Ausbeute gelbe Nadeln ab, die nun (auch nach dem Trocknen im Hochvakuum) bei 192–194° (korr.) nach vorherigem Sintern schmelzen.

0.1186 g Sbst. (bei 56°, 0.2 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getr.): 0.2606 g CO<sub>2</sub>, 0.0654 g H<sub>2</sub>O. — 3.850 mg Sbst. (bei 56°, 0.2 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getr.): 0.549 ccm N (23°, 754 mm, nach Pregl).

C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub> (441.3). Ber. C 59.82, H 6.17, N 15.87.

Gef. „ 59.93, „ 6.17, „ 16.31.

Die niedrigschmelzende Form ist gelb gefärbt und ist zunächst in Methanol leicht löslich; die hochschmelzende ist dagegen fast farblos mit einem Stich ins Gelbe und ist in Methanol sehr schwer löslich. Vielleicht handelt es sich um *cis-trans*-Isomerie Schiffischer Basen. Zur Darstellung des freien Dipeptids diente stets die hochschmelzende Form. Bei der Hydrolyse der höherschmelzenden Form der Salicyliden-Verbindung (1.5 g) wurden 0.55 g *d*-Tyrosin von  $[\alpha]_D^{25} = +9.6^{\circ}$  in 4-proz. Salzsäure und 0.7 g Benzyliden-arginin erhalten und hieraus wieder ein Arginin-Nitrat von  $[\alpha]_D^{25} = +9.8^{\circ}$ .

Freies *d*-Tyrosyl-*d*-arginin: 5 g Salicyliden-Verbindung wurden mit etwas mehr als der für 1 Äquivalent berechneten Menge Schwefelsäure auf dem Wasserbade erwärmt. Der abgespaltene Salicylaldehyd wurde ausgeäthert, der wäßrige Teil mittels Baryts genau von der Schwefelsäure befreit und das Filtrat vom Bariumsulfat unter sorgfältigem Ausschluß der Luft-Kohlensäure aus einem Bade von 35° im Vakuum stark eingengt. Beim Stehen der konz. Lösung im Exsiccator über Calciumchlorid und Natronkalk scheidet sich das Dipeptid in Form rechteckiger Blättchen aus. Mit 96-proz. Alkohol aufs Filter gebracht: 2.1 g.

Zur Analyse wurde aus wenig heißem Wasser krystallisiert und bei 56° und 0.2 mm über Phosphorpentoxid getrocknet.

0.1312 g Sbst.: 0.2572 g CO<sub>2</sub>, 0.0819 g H<sub>2</sub>O. — 3.775 mg Sbst.: 0.697 ccm N (bei 23°, 749 mm, nach Pregl).

C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub> (337.2). Ber. C 53.38, H 6.87, N 20.77.

Gef. „ 53.46, „ 6.98, „ 20.98.

$[\alpha]_D^{25} = -6.79^{\circ} \times 3.2441 / 1 \times 1.013 \times 0.2058 = -105.7^{\circ}$  (in  $n/5$ -Salzsäure).

Das Dipeptid ist ziemlich löslich in Wasser, dagegen in organischen Lösungsmitteln schwer oder gar nicht löslich. Beim raschen Erhitzen schmilzt es unt. Zers. bei 200–202° (korr.). Mit Phosphorwolframsäure gibt es auch in recht verdünnter Lösung eine starke Fällung; mit Silbernitrat und Natrolauge entsteht ein weißer, käsiger Niederschlag.

#### *d*-Tyrosyl-*d*-arginin-anhydrid (VI).

8 g Salicyliden-*d*-tyrosyl-*d*-arginin (hochschmelzende Form) wurden mit etwas mehr als der berechneten Menge wäßriger Salzsäure auf dem Wasserbade erwärmt, der abgespaltene Salicylaldehyd ausgeäthert und die wäßrige Schicht unter vermindertem Druck verdampft. Der Rückstand wurde oft in wasser-freiem Methylalkohol gelöst und wieder verdampft, um das Wasser möglichst vollständig zu entfernen. Der sirupöse Rückstand wurde in 80 ccm trockenem Methanol gelöst und bei 10° mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt. Nach Abdampfen wurde die Veresterung auf dieselbe Weise nochmals vorgenommen. Schließlich wurde das sirupöse Vereste-

rungsprodukt in 80 ccm trockenem Methylalkohol gelöst und mit Ammoniakgas bei  $-15^{\circ}$  gesättigt. Nach 5-tägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wurde verdampft, der Rückstand mit 25 ccm 96-proz. Alkohol aufgeköcht, erkalten gelassen, abgesaugt und aus der nötigen Menge heißem Wasser umkrystallisiert: 0.8 g. Farblose Blättchen. Sie waren das salzsaure Salz des Dioxo-piperazins.

Zur Analyse bei  $78^{\circ}$ , 0.1 mm über  $P_2O_5$  getrocknet.

4.425 mg Sbst.: 8.250 mg  $CO_2$ , 2.493 mg  $H_2O$ . — 3.425 mg Sbst.: 0.581 ccm N ( $23^{\circ}$ , 758 mm, nach Pregl). — 4.985 mg Sbst.: 2.081 mg AgCl (direkt gefällt).

$C_{15}H_{22}O_3N_3Cl$  (355.7). Ber. C 50.60, H 6.24, N 19.69, Cl 9.97.  
Gef. „ 50.85, „ 6.30, „ 19.51, „ 10.33.

$[\alpha]_D^{25} = -0.93^{\circ} \times 3.5227 / 1 \times 1.002 \times 0.0808 = -40.4^{\circ}$  (in Wasser).

Die getrocknete Substanz sintert stark gegen  $165^{\circ}$  (korr.) und schmilzt aber erst gegen  $220^{\circ}$  (korr.) unter völliger Zersetzung. Das salzsaure Anhydrid gibt mit Kalium-Wismut-Jodid einen roten Niederschlag, mit Sublimat in Gegenwart von Natriumacetat eine weiße Fällung; mit soda-alkalischer Pikrinsäure-Lösung gibt es erst beim Erwärmen eine sehr schwache rötliche Färbung. Aus wäßrigen Lösungen des Hydrochlorids scheiden Alkalien das freie Anhydrid in Form langer Nadeln ab. Es ist in Wasser schwer löslich.

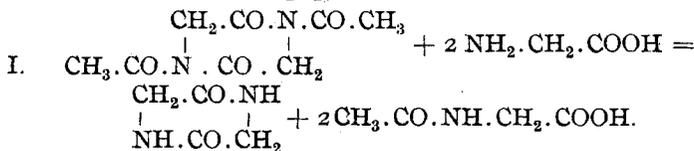
Setzt man das Anhydrid aus seinem Hydrochlorid in der eben erwähnten Weise in Freiheit, läßt die Lösungen stundenlang stehen und verwendet sie nachher für die optische Untersuchung als salzsaures Salz, so macht sich nur ein langsamer Abfall der Drehung bemerkbar. Am günstigsten verlief ein Versuch, den wir in  $n_{50}$ -Lösung durchführten. Nach 15 Stdn. war aber auch hier nur ein Abfall der Drehung um etwa 16% zu konstatieren. Wenn wir in etwas konzentrierteren Lösungen arbeiteten, so schied sich das freie Dioxo-piperazin in mehr oder weniger großen Beträgen aus, und dann war überhaupt keine Drehungsverminderung zu bemerken.

### 306. Max Bergmann, Vincent du Vigneaud<sup>1)</sup> und Leonidas Zervas: Acylwanderung und Spaltungsvorgänge bei acylierten Dioxo-piperazinen<sup>2)</sup>

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Leder-Forschung, Dresden.]

(Eingegangen am 8. Juni 1929.)

Wenn man *N, N'*-Diacetyl-2.5-dioxo-piperazin mit einem Alkalisalz des Glykokolls in wäßriger Lösung zusammenbringt, so wandern die Acetylene vom Dioxo-piperazin zur Aminosäure, und es entsteht Acetur-säure neben freiem Dioxo-piperazin:



Das freie *d*-Arginin als stark basische Aminosäure entreißt, ohne daß man erst Alkali zuzusetzen braucht, dem acylierten Dioxo-piperazin

<sup>1)</sup> Fellow National Research Council.

<sup>2)</sup> 29. Mitteilung über Umlagerung peptid-ähnlicher Stoffe; 27. und 28. Mitteilung voranstehend.