

Über die Zersetzung von α -Amino-N-carbonsäureanhydriden mit Pyridin und Pyridinderivaten. (Zur Frage der Bildung von höhermolekularen Cyklopeptiden.)

Untersuchungen über α -Amino-N-carbonsäureanhydride. VII*.

Von

L. Bilek, J. Derkoseh, H. Miehle und F. Wessely.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Mai 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Juni 1953.)

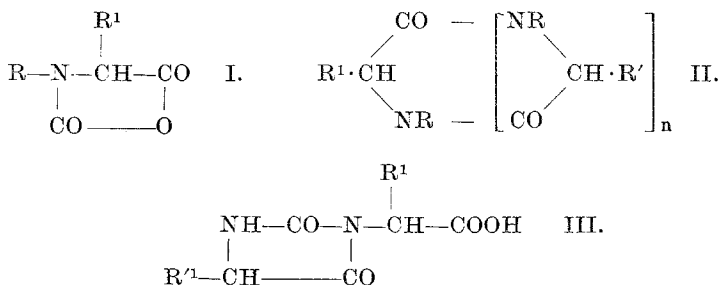
Es wird gezeigt, daß bei der Zersetzung von α -Amino-N-carbonsäureanhydriden der allgemeinen Formel I durch Pyridinverbindungen Stoffe entstehen, die sehr wahrscheinlich höhermolekulare Cyklopeptide darstellen. Analog Pyridin wirken auch andere Pyridinabkömmlinge, Chinolin und Isochinolin. Die Molekulargewichte dieser Verbindungen sind wegen der großen Schwierigkeiten noch nicht genau bestimmt worden; sie nehmen mit steigender Menge der zersetzenden Base ab. Nur in manchen Fällen läßt sich das einfachste Cyklopeptid, das entsprechende Dioxopiperazin, nachweisen.

Die Zersetzung bestimmter α -Amino-N-carbonsäureanhydride durch Pyridin wurde von dem einen von uns (F. Wessely)¹ vor längerer Zeit beschrieben. Es wurden damals die N-Carbonsäureanhydride des Glykokolls, Sarkosins und Phenylalanins untersucht. Als Reaktionsprodukte wurden aus den am Stickstoff unsubstituierten Carbonsäureanhydriden erhalten:

- a) in der Hauptmenge ätherunlösliche Stoffe, die auf Grund ihrer analytischen Zusammensetzung als Cyklopeptide II aufzufassen waren;
- b) als Nebenprodukte ätherlösliche Hydantinderivate der allgemeinen Formel III.

* VI. Mitteilung: Mh. Chem. 81, 861 (1950).

¹ F. Sigmund und F. Wessely, Z. physiol. Chem. 157, 91 (1926). — F. Wessely, ibid. 146, 72 (1925). — F. Wessely und F. Sigmund, ibid. 159, 102 (1926). — F. Wessely und M. John, ibid. 170, 38 (1927).



R und R¹ = H, Alkyl oder Aralkyl n = 1 oder größer als 1

Bei dem am Stickstoff substituierten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid ist natürlich die Bildung eines Stoffes des letztgenannten Typus (Hydantoinderivat) unmöglich.

Schon damals wurde der Reinigung des Pyridins die größte Sorgfalt zugewendet, um den Einwand auszuschließen, daß verunreinigende primäre oder sekundäre Basen oder Wasser das eigentliche, die Zersetzung auslösende Agens sei. Wenn das Pyridin an sich die Zersetzung bewirkt und in dem verwendeten Carbonsäureanhydrid keine andere Startsubstanz vorhanden ist, müssen Cyklopeptide entstehen, da das Pyridin nicht als Endgruppe eintreten kann; sonst ist mit der Bildung von Peptiden bzw. substituierten Amiden von solchen zu rechnen. Wie das Pyridin die Zersetzung bewirkt, möge hier nicht diskutiert werden, obwohl *Th. Wieland*² einen Reaktionsmechanismus aufgestellt hat.

Bei unseren neuen Versuchen haben wir das über das Perchlorat gereinigte Pyridin nach seiner Trocknung über KOH und BaO noch mit C₂H₅MgBr in Reaktion gebracht und dann im Wasserstrahlvakuum über eine Kolonne bei peinlichstem Feuchtigkeitsausschluß destilliert (vgl. S. 727). Auch das so gewonnene Pyridin zersetzte die oben genannten N-Carbonsäureanhydride mit großer Geschwindigkeit (nach längstens 1 Std. war von den oben genannten Aminosäuren kein unzersetztes N-Carbonsäureanhydrid mehr nachzuweisen). Es ist also nicht daran zu zweifeln, daß das Pyridin allein die Zersetzung bewirkt.

Für das Vorliegen von Cyklopeptiden sprechen zunächst die allerdings allein nicht beweiskräftigen Analysen der erhaltenen Stoffe, von welchen wir bisher nur die unter a angeführten Pyridinzersetzungsprodukte von Glykokoll und Sarkosin¹ publiziert haben. Auch das analoge Produkt aus D,L-Phenylalanin zeigt die analytische Zusammensetzung eines Cyklopeptids. Das gleiche ist der Fall für die ätherunlöslichen Zersetzungsprodukte des zuletzt genannten Amino-N-carbonsäureanhydrids mit Chinolin und Isochinolin. Daneben wurden in beiden letztgenannten Fällen auch die ätherlöslichen Hydantoinverbindungen gefunden.

² *Th. Wieland*, *Angew. Chem.* **63**, 7 (1951).

Leider scheiterten alle Bemühungen, für die so erhaltenen Zersetzungsprodukte des Glycinsl und Phenylalanins ein geeignetes Lösungsmittel für die weiteren Untersuchungen zu finden. Deshalb haben wir uns neuerlich mit der Untersuchung des Pyridinzersetzungsproduktes des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids befaßt. Vor allem interessierten uns die Fragen, ob sich

1. durch Variation der Konzentration des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids in Pyridin Stoffe verschiedenen Molekulargewichtes erhalten lassen. Es war zu erwarten, daß die Molekulargewichte um so größer sein würden, je konzentrierter die Pyridinlösung an dem N-Carbonsäureanhydrid ist;

2. über den analytischen Befund hinaus Anhaltspunkte für die Cyklopeptidstruktur finden ließen.

Zur Beantwortung der Frage 1 haben wir versucht, das Molekulargewicht in schmelzendem Phenol auf kryoskopischem Wege oder nach der Methode der isothermen Destillation nach *K. Schwarz*³ in Wasser oder Pyridin zu bestimmen. Die so gewonnenen experimentellen Ergebnisse waren aber äußerst unbefriedigend; die Werte waren in schmelzendem Phenol wesentlich kleiner als in Wasser; die Ergebnisse waren aber auch nicht genau reproduzierbar. Wir müssen vermuten, daß unbekannt gebliebene methodische Fehler der Grund für die schlechten Ergebnisse waren. Wir sehen deshalb hier von einer Wiedergabe unserer Versuche ab.

Daß die Teilchengröße der Pyridinzersetzungsprodukte des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids von der Konzentration dieses Stoffes in Pyridin abhängig ist, folgt aus den Messungen der Viskosität wäßriger und alkoholischer Lösungen solcher Produkte. Hierfür wurde eine bestimmte Menge (0,5 bis 0,509 g) des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids mit einer gemessenen Menge reinsten Pyridins zersetzt und das Zersetzungsprodukt auf verschiedene Weise isoliert. Entweder wurde

a) das Pyridin nach beendeter Zersetzung im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz abgedunstet oder

b) das Zersetzungsprodukt aus der Pyridinlösung durch Äther gefällt.

In den Tabellen 10 und 11 (exper. Teil, S. 732/33) sind die entsprechenden Daten zusammengefaßt. Man ersieht daraus eine deutliche Zunahme der Viskosität, die bei den Produkten, die bei größerer Konzentration an N-Carbonsäureanhydrid in Pyridin gewonnen wurden, eintritt. Es lassen sich aber keine Molekulargewichte aus den Viskositätsdaten ableiten, weil für die untersuchten Stoffe keine Beziehung zwischen Molekulargewicht und Viskosität bekannt ist. Ein Vergleich der erhaltenen

³ *K. Schwarz*, Mh. Chem. 53/54, 926 (1929).

Viskositäten mit der von Sarkosinanhydrid (N,N'-Dimethyl-dioxo-piperazin; synthetisch dargestellt und analysenrein) von $\eta_{sp} = 0,022$ ($c = 10,084$ g/l) zeigt, daß auch in dem mit der größten Pyridinmenge erhaltenen Zersetzungsprodukt höher molekulare Stoffe enthalten sein müssen. Die von uns gemessenen Viskositätswerte sind von der gleichen Größenordnung wie die von *J. H. Fessler* und *A. G. Ogston*⁴ gemessenen, die als Startsubstanz Sarkosindimethylamid verwendeten.

Es ist uns nicht gelungen, eine Methode zu finden, mit deren Hilfe das Vorliegen von Cyklopeptiden einwandfrei nachgewiesen werden könnte. Die im folgenden mitgeteilten Versuche machen im ganzen eine Cyklopeptidstruktur nur sehr wahrscheinlich.

Bei der Bildung von Cyklopeptiden mußte der nach der Pyridin-zersetzung eingetretene Gewichtsverlust dem für die Abspaltung von 1 Mol CO₂ aus 1 Mol des N-Carbonsäureanhydrids entsprechen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 festgehalten. Bei den Versuchen haben wir wieder eine bestimmte Menge des N-Carbonsäureanhydrids (0,5 bis 0,509 g) mit wechselnden Mengen (ml) Pyridin (Spalte 1) zersetzt und

Tabelle 1.

Präparat Nr.	1	2
1	1	66,7
2	2,5	66,1
3	5	66,1
4	10	65,4
5	25	65,3
6	50	65,3

Theoretischer Wert 61,7

das Pyridin im Vak. über konz. Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz abgedunstet. Es wurde dann das Gewicht des Rückstandes (Spalte 2) bestimmt — es ist in Prozenten der eingesetzten Menge von Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid angegeben — und mit dem theoretisch zu erwartenden Wert verglichen. Wie aus den Werten der Tabelle 1 hervorgeht, war der experimentell gefundene Rückstand immer größer als der berechnete. Dies

konnte zwei Gründe haben: 1. daß das CO₂ nicht quantitativ abgespalten wird und 2. daß die erhaltenen Produkte noch das Zersetzungsreagens Pyridin enthalten.

Tabelle 2.

1	2	3	4	5	6
0,53355	5	0,20243	0,20414	0,84	+ 0,3
0,44666	5	0,17001	0,17090	0,52	0,0
0,27237	5	0,10391	0,10412	0,20	— 0,3

1: Eingesetzte Menge Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid (in g).

2: ml reinstes Pyridin.

3: Menge des gravimetrisch gefundenen CO₂ (in g).

4: Theoretisch zu erwartende Menge CO₂.

⁴ Trans. Faraday Soc. **47**, 667 (1951).

- 5: Differenz zwischen theoretisch berechnetem und experimentell gefundenem CO_2 (in %) ohne Berücksichtigung der Löslichkeit von CO_2 in Pyridin.
- 6: Wie bei 5, nur mit Berücksichtigung der Löslichkeit von CO_2 in Pyridin.

Zu 1. Das CO_2 wird quantitativ abgespalten, wie besondere Versuche ergaben, deren Durchführung im exper. Teil beschrieben wird und deren Ergebnisse in Tabelle 2 enthalten sind. Die Abweichungen der gefundenen von den theoretischen Werten liegen, wenn man die Löslichkeit des CO_2 im Pyridin unter den Versuchsbedingungen berücksichtigt, bei etwa $\pm 0,3\%$. Daß das für diese Versuche verwendete Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid vollkommen rein war, folgt aus den bei der thermischen Zersetzung bei 130 bis 140° C gravimetrisch erhaltenen CO_2 -Mengen, die $100 \pm 0,5\%$ d. Th. betragen.

Zu 2. Die über konz. Schwefelsäure im Vak. zur Gewichtskonstanz gebrachten Pyridinzersetzungsprodukte des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids enthalten aber noch Pyridin, das auch durch tagelanges Extrahieren mit Äther im Soxhlet nicht entfernt werden konnte. Bei 96stündiger Behandlung mit absol. Äther gingen aus 1,695 g Polymerisat nur 0,093 g eines öligen, nach Pyridin riechenden Produktes in Lösung. Wurde nun das mit absol. Äther im Soxhlet extrahierte Produkt in Wasser gelöst und erschöpfend im Schacherl mit Äther behandelt, so findet sich im Ätherextrakt Pyridin. So wurde z. B. in dem obigen Produkt (erhalten bei der Polymerisation von 2,458 g Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid mit 25 ml Pyridin) ein Pyridingehalt von 4,71% durch die Bildung des Pikrolonats nachgewiesen, das wegen seiner äußerst geringen Löslichkeit in Alkohol und Äther dazu besonders geeignet ist. Als Mittelwert aus mehreren Versuchen ergab sich ein Pyridingehalt des Polymerisats von etwa 4,5%. Der Pyridingehalt der Polymerisate des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids ist wesentlich kleiner, wenn jene mit Äther aus der Pyridinzersetzungslösung ausgefällt werden; er liegt dann bei zirka 0,5% Pyridin.

Auch bei Pyridinabkömmlingen beobachtet man, daß diese nach vollendeter Zersetzung äußerst hartnäckig von dem Polymerisat des betreffenden N-Carbonsäureanhydrids zurückgehalten werden. Das ist vor allem für den Nicotinsäure-äthylester der Fall. Wir haben mit dieser Verbindung neben Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid auch andere N-Carbonsäureanhydride zersetzt, nach dem Verdampfen des Nicotinsäureesters und Ätherextraktion des festen Rückstandes in den ätherunlöslichen Polymerisaten durch eine *Zeisel*-Bestimmung den Äthoxylgehalt bestimmt und daraus den Gehalt an Nicotinsäureäthylester errechnet. Die für die verschiedenen N-Carbonsäureanhydride differenten Werte sind in der Tabelle 3 angegeben.

Auch α -Chlorpyridin und α -Methoxypyridin werden von dem zersetzten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid hartnäckig, wenn auch in kleineren Mengen, zurückgehalten (vgl. exper. Teil, S. 736, Tabelle 12).

Tabelle 3.

N-Carbonsäureanhydrid aus	Nicotinsäureäthylester- gehalt des Polymerisats in %
Glycin	7,2
Sarkosin	19,5
D,L-Phenylalanin	3,6
N-Cyklohexyl-glycin	8,3
N-Benzyl-glycin	13,6

Wird ein Pyridinpolymerisat des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids mit Nicotinsäureäthylester längere Zeit auf der Schüttelmaschine geschüttelt (0,3 g Polymerisat mit 3 ml Nicotinsäureester 2 Wochen hindurch ohne Unterbrechung), so kann

nach anschließender 3tägiger Ätherextraktion im Soxhlet und Trocknung im Hochvakuum nach Zeisel Äthoxyl nachgewiesen werden; es wurde 0,88% OC_2H_5 gefunden, woraus sich ein Nicotinsäureestergehalt von 2,96% errechnet; es ist also in das Pyridinpolymerisat Nicotinsäureäthylester eingetreten.

Das zähe Festhalten von Pyridin und den anderen Pyridinderivaten ist eine Tatsache, die deshalb Beachtung verdient, weil z. B. aus den Pyridinzersetzungsprodukten der N-Carbonsäureanhydride des Glykokolls und Phenylalanins mit Äther die niedrigmolekularen Hydantoinderivate zu extrahieren sind, ohne daß dabei das Pyridin quantitativ entfernbar ist. Ob es sich hier eventuell um Einschlußverbindungen handelt, wäre auf jeden Fall in Betracht zu ziehen.

Man muß also bei der Beurteilung der Struktur der Pyridinzersetzungsprodukte der N-Carbonsäureanhydride aus den Werten der Analyse auf den wechselnden Gehalt an Pyridin Rücksicht nehmen. Beim Phenylalanin liegen die C, H-Werte für das polymere Cyklopeptid und Pyridin so nahe, daß sich ein Gehalt an letzterem nicht auswirken kann. Anders liegen die Verhältnisse aber beim Glykokoll und Sarkosin. Für unsere Untersuchungen haben wir wieder das Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid herangezogen: 5,762 g N-Carbonsäureanhydrid wurden mit 58 ml reinstem Pyridin polymerisiert; nach 3 Tagen wurde mit 250 ml absol. Äther gefällt, filtriert und im Soxhlet mit absol. Äther extrahiert. Nach Trocknung des Polymerisats im HV wurde folgender Wert erhalten:

C 50,95, H 6,69. Diesem seien gegenübergestellt:

C 50,6, H 7,03 theoret. Wert für reines Cyklopeptid;

C 75,9, H 6,33 theoret. Wert für Pyridin;

C 50,7, H 7,02 theoret. Wert für Cyklopeptid, bei einem experimentell bestimmten Gehalt von 0,5% Pyridin.

Dieses Polymerisat wurde nun in Wasser gelöst, im Schacherl erschöpfend mit Äther extrahiert und nach Eindampfen und Trocknen im Hochvak. wieder analysiert, wobei folgende Werte erhalten wurden:

C 50,21, H 6,94.

Bei einem Polymerisat, bei dem das Pyridin durch Abdunsten im Vak. weitgehend entfernt wurde, wurden folgende Werte erhalten:

C 51,02, H 7,13 nach der Behandlung im Soxhlet;

C 50,25, H 7,10 nach der Behandlung im Schacherl;

C 51,64, H 7,00 theoret. Wert für das Cyklopeptid, bei einem experimentell bestimmten Gehalt von 4,08% Pyridin.

Da die untersuchten Stoffe höher molekular sind, können die analytischen Werte nicht als strenger Beweis für eine Cyklopeptidstruktur gewertet werden, da jene durch einen geringen Gehalt an Endgruppen oder anderen irgendwie gebundenen Fremdstoffen keine außerhalb der Fehlergrenzen fallende Änderungen erfahren würden.

Zur Frage 2 (S. 719): Für die Beurteilung der Struktur von Pyridinpolymerisaten des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids schienen uns zuerst *elektrophoretische Untersuchungen* von Interesse. Zu diesen wurden Zersetzungsprodukte verwendet, die (vgl. exper. Teil, S. 731) unter Verwendung eines besonders gereinigten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids und Pyridins im Hochvak. erhalten wurden. Es wurden 3 Präparate dargestellt (Tabelle 4):

Tabelle 4.

Präparat Nr.	Sarkosin-N-carbon- säureanhydrid in Gramm	Pyridin in ml
1	0,5	2,98
2	0,5	4,89
3	0,5	9,42

Mit diesen Präparaten wurden auch die Viskositätsbestimmungen in Alkohol ausgeführt, die in der Tabelle 10 enthalten sind.

Die elektrophoretische Untersuchung (freie Elektrophorese in der Apparatur von H. Michl⁵) ergab in einem Phosphatpuffer nach Sørensen (pH = 7,9, μ = 0,1) folgende Ergebnisse:

Bis auf das Präparat 2, bei dessen Darstellung auch gewisse Unregelmäßigkeiten zu beobachten waren, sind die Produkte als einheitlich zu betrachten. Die Form der Gradientenkurve ist nicht ganz symmetrisch,

Tabelle 5.

Präparat Nr.	Beweglichkeit in $\text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{sec}^{-1}$			
	Hauptmenge		Nebenmenge	
1	— 0,4	100%	0	0
2	— 0,5	97,4%	{ + 0,8	1,4%
3	— 0,7	100%		1,2%
			0	0

⁵ H. Michl, Mh. Chem. 82, 23 (1951).

doch konnten auch bei verlängerten Versuchszeiten keine Auftrennungen beobachtet werden. Die Beweglichkeiten sind sehr gering, sie zeigen einen Anstieg mit der durch die Viskosität nachgewiesenen Zunahme der Teilchengröße. Weniger sorgfältig dargestellte Cyklopeptidpräparate sind inhomogener, aber es ist immer eine sehr langsam wandernde Hauptkomponente im Betrage von 97,5 bis 99% vorhanden, so daß durch die elektrophoretische Untersuchung das Vorliegen von Cyklopeptiden gestützt erscheint, und auch die *Papierelektrophorese* nach H. Michl⁶ führt zum gleichen Schluß. Mit Sicherheit wird das Vorliegen einer größeren Zahl ionisierter Gruppen in dem untersuchten Produkt ausgeschlossen.

Zum gleichen Schluß führten die Ergebnisse der *elektrometrischen Titration*:

Präparat 2 und 3 wurden nach der elektrophoretischen Untersuchung phosphatfrei dialysiert, im Vak. über P_2O_5 eingetrocknet und zuerst mit 0,2 n HCl bis zu einem pH-Wert von 2,0 eingestellt. Dann wurde mit 0,2 n NaOH bis zum pH = 12 titriert. Die Titrationskurven zeigen keine Stufen, die auf eine schwache Säure oder Base hindeuten würden.

Aber auch auf chemischem Wege ist das Vorliegen von Cyklopeptiden in den Pyridinzersetzungsprodukten des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids zu stützen. Wir haben uns dabei der Umsetzung mit dem *Reagens von Sanger*, dem 2,4-Dinitro-1-fluorbenzol (DNFB) bedient. Aus dem Pyridinzersetzungsprodukt Nr. 4 der Tabelle I wurde, wie im exper. Teil näher beschrieben wird, das Dinitrophenylderivat (DNP-Derivat) dargestellt und entsprechend aufgearbeitet. Es wurde letztes Endes der Gehalt an DNP-Resten in dem mit DNFB behandelten Polysarkosin kolorimetrisch bestimmt und auf DNP-Sarkosin umgerechnet. Es ergab sich im DNP-Polysarkosinderivat ein Gehalt von 0,222% DNP-Sarkosin; daraus würde sich ein Molekulargewicht von 114800 berechnen, wenn das Peptid als offenkettig angesehen wird. Da aber ein derartig hohes Molekulargewicht äußerst unwahrscheinlich ist, wird man neben kürzeren, offenen Ketten hauptsächlich Cyklopeptide annehmen müssen.

Wir haben es also mit diesen Versuchen wahrscheinlich gemacht, daß in den *Pyridinzersetzungsprodukten* des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids vorwiegend *Cyklopeptide* vorliegen, über deren Molekulargröße allerdings noch keine exakten Angaben gemacht werden können.

Es wurden auch Versuche angestellt, über die im exper. Teil näher berichtet wird, die *Teilchengröße durch Diffusionsmessungen* (vgl. S. 732) zu bestimmen. Die Schwierigkeiten, die sich hierbei ergeben, liegen in der Abweichung vom *Fickschen Gesetz*, wie sie vor allem bei dem mit wenig Pyridin erhaltenen Polymerisationsprodukt auftraten, und in der

⁶ H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 (1951).

Wahl der Beziehung zwischen Diffusionskonstante und Teilchengröße. Im vorliegenden Fall errechneten sich mit Hilfe der für Proteine abgeleiteten *Polson*schen Formel für eine Fraktion, die unter Verwendung von viel Pyridin erhalten worden war, eine Teilchengröße von 22000.

Der Pyridinzersetzung sind, wie der eine von uns (*F. W.*¹⁾ schon vor längerer Zeit angegeben hatte, alle N-Carbonsäureanhydride zugänglich, die am Stickstoff unsubstituiert sind, und von den N-substituierten nur solche, die andere als aromatische Reste tragen; also von N-Carbonsäureanhydriden der allgemeinen Formel I (S. 718) nur solche, bei denen $R = H$, Alkyl, Aralkyl oder Cykloalkyl ist. Dies konnten wir an einer Reihe neuer Versuche wieder bestätigen. Die Zersetzungsgeschwindigkeit der verschiedenen N-Carbonsäureanhydride ist aber nicht gleich groß. Quantitative Messungen haben wir mit Pyridin als zersetzendem Agens noch nicht angestellt. Qualitativ aber ließ sich vorderhand folgendes feststellen: während z. B. die N-Carbonsäureanhydride von Glykokoll, Phenylalanin und Sarkosin bei Zimmertemperatur in 1 Std. vollkommen zersetzt sind, dauert die Zersetzungsreaktion mit anderen N-Carbonsäureanhydriden viel länger; beim N-Isobutylglycin-N-carbonsäureanhydrid beginnt sichtbare CO_2 -Entwicklung erst nach etwa 12 Stdn.; beim N-Cyklohexyl-glycin-N-carbonsäureanhydrid beginnt Trübung (Ausfall des entsprechenden Diketopiperazins) und Gasentwicklung erst nach etwa 36 Stdn. Ein aromatisch substituiertes N-Carbonsäureanhydrid (in Formel I $R' = H$ und $R = o\text{-Tolyl}$) reagiert mit Pyridin im Verlaufe von einigen Tagen bei Zimmertemperatur überhaupt nicht, sondern kann unverändert zurückgewonnen werden.

Wir hatten ursprünglich die Absicht, die Abhängigkeit der Molekulargröße der bei der Pyridinzersetzung der N-Carbonsäureanhydride (vor

erst N-substituierte Glycine verwenden) gebildeten Cyklopeptide von der Art des Restes, der den Stickstoff substituiert, zu untersuchen. Da wir aber keine exakten Molgewichte bestimmen konnten, mußten wir uns darauf be-

Tabelle 6.

N-Carbonsäureanhydrid	Ausbeute an 2,5-Dioxopiperazin in % d. Th.
N-Methylglycin	Spur
N-Äthylglycin	wenig
N-Isobutylglycin	8
N-Cyklohexylglycin	35,4
N-Benzylglycin	9
N-Phenäthylglycin	Spur

schränken, die Menge des einfachsten Cyklopeptides, des entsprechenden Dioxopiperazins, zu bestimmen. Die folgende Tabelle 6 zeigt die erhaltenen Ausbeuten, die sehr verschieden sind. Es wurde immer 1 g des betreffenden N-Carbonsäureanhydrids mit 10 ml reinstem Pyridin zersetzt.

Die Menge des erhaltenen Diketopiperazins hängt aber auch von der Menge des Pyridins ab, das zur Zersetzung verwendet wird. Das haben wir an einem Beispiel näher untersucht: wurde N-Benzylglycin-N-carbonsäureanhydrid mit der 200fachen Gewichtsmenge Pyridin bei Zimmertemperatur zersetzt, so erreichte die Ausbeute an N,N'-Dibenzyl-2,5-diketopiperazin 80,7% d. Th.; diese Methode stellt auch somit eine sehr gute Darstellung dieses Diketopiperazins dar. Hier ist auch der beim Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid auf Grund der Viskositätsbestimmungen erhobene Befund, daß die Bildung von Produkten niedrigeren Molekulargewichtes durch Verkleinerung der Konzentration des N-Carbonsäureanhydrids im Pyridin begünstigt wird, präparativ bewiesen worden. Ein Teil der erhaltenen Dioxopiperazine war bisher unbekannt. Über die Darstellungen und Eigenschaften dieser Verbindungen finden sich nähere Angaben im Versuchsteil.

Experimenteller Teil.

Darstellung der N-Carbonsäureanhydride und Reinigung der Zersetzungsmittel.

Die Darstellung der α -Amino-N-carbonsäureanhydride erfolgte zum Großteil ausgehend von der entsprechenden N-Carbalkoxyverbindung über die Säurechloride durch Erhitzen im Vak.⁷ Die Säurechloride wurden meistens unter Verwendung von Thionylchlorid dargestellt, doch erwies sich die Reinigung der aus diesen Säurechloriden hergestellten N-Carbonsäureanhydride als zeitraubend und verlustreich. Schneller konnte bei Verwendung von PCl_5 zur Darstellung des Säurechlorids gearbeitet werden und die aus den so erhaltenen Säurechloriden gewonnenen rohen N-Carbonsäureanhydride erwiesen sich auch als viel reiner. N-substituierte N-Carbonsäureanhydride wurden auch nach⁷ aus den Carbalkoxyverbindungen mit Acetylchlorid und Acetanhydrid gewonnen; diese Darstellungsweise erwies sich besonders für die Gewinnung des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids als wertvoll. Das D,L-Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid und andere N-Carbonsäureanhydride wurden auch durch Einwirkung von Phosgen auf die Aminosäure in Toluollösung gewonnen⁸.

Die allgemeinen Eigenschaften der N-Carbonsäureanhydride wurden bereits von verschiedener Seite beschrieben, so daß wir auch bei den neu dargestellten Verbindungen dieser Klasse von derartigen Angaben absehen können.

Die Reinigung der N-Carbonsäureanhydride ist wegen der sehr großen Empfindlichkeit dieser Verbindungen, vor allem gegenüber Spuren von Wasser, unter Umständen schwierig; sie erfolgte fast ausschließlich durch Umlösen oder Umfällung unter peinlichster Vermeidung von Feuchtigkeit Zutritt; die Lösungsmittel wurden auf die übliche Weise absolutiert und aufbewahrt, die verwendeten Reaktionsgefäße dementsprechend vorge-trocknet. Einige wenige N-Carbonsäureanhydride konnten im Vak. der Quecksilberdampfstrahlpumpe destilliert werden.

⁷ F. Wessely, K. Riedl und H. Tuppy, Mh. Chem. 81, 861 (1950).

⁸ A. L. Levy, Nature 165, 152 (1950) und andere.

Auch der Reinigung der Zersetzungsmittel wurde die peinlichste Sorgfalt zugewendet:

a) Pyridin, das zuerst über das Perchlorat gereinigt worden war, wurde anschließend über KOH und BaO getrocknet. Die meisten Versuche wurden nun mit dem so gewonnenen Präparat, das über BaO aufbewahrt wurde, durchgeführt (Pyridin I). Zu einer aus 1,6 g Mg, 7,3 g Äthylbromid und 10 ml Äther bereiteten Lösung von C_2H_5MgBr wurden 60 ml des Pyridin I zugegeben. Von dem gebildeten Niederschlag wurde über eine mit *Raschig*-Ringen gefüllte Kolonne das Pyridin unter peinlichstem Feuchtigkeitsausschluß bei 13 Torr und $21^\circ C$ in eine Vorratsflasche, die ebenfalls gegen Feuchtigkeitszutritt geschützt war, destilliert. Auch mit diesem Präparat (Pyridin II) trat Zersetzung der N-Carbonsäureanhydride ein.

b) Das verwendete Chinolin wurde ebenfalls mit C_2H_5MgBr -Lösung versetzt und dann destilliert.

c) Isochinolin, Nicotinsäureäthylester, α -Chlorpyridin- α -Methoxypyridin reinigten wir durch Destillation unter Feuchtigkeitsausschluß, wobei aus der bei der richtigen Temperatur übergelenden Fraktion die ersten und letzten Anteile abgetrennt und nicht verwendet wurden. Die Reinheit des verwendeten Nicotinsäureäthylesters haben wir auch durch eine Mikro-Zerewitinoff-Bestimmung überprüfen lassen.

Pyridinzersetzung der α -Amino-N-carbonsäureanhydride.

Bis auf bestimmte Zersetzungsversuche des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids, die weiter unten ausführlicher beschrieben werden, wurde folgendermaßen verfahren: zu der Einwaage des N-Carbonsäureanhydrids gaben wir bei Zimmertemp. die entsprechende Menge Pyridin. Nach beendeter Zersetzung, wobei wir nie über Zimmertemp. gingen, erfolgte die Aufarbeitung nach folgenden zwei Methoden:

Methode a. Das Pyridin wurde im Vak. bei Zimmertemp. oder etwas erhöhter Temp. abgetrieben und der Rückstand dann im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure so weit als möglich vom Pyridin befreit und dann erschöpfend mit Äther extrahiert.

Methode b. Aus der Lösung in Pyridin wurde durch Zusatz von Äther das Zersetzungsprodukt ausgefällt und dieses nach Filtration erschöpfend mit Äther behandelt.

Die bei den einzelnen N-Carbonsäureanhydriden erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Wir müssen wegen der gebotenen Kürze auf die genauere Beschreibung der Aufarbeitung der ätherlöslichen Produkte, aus welchen die entsprechenden Dioxopiperazine erhalten wurden, verzichten. Im Prinzip wurden diese durch eine geeignete Kombination von Kristallisation und Destillation gereinigt und immer durch Analyse, Schmp. und Mischschmp. eindeutig identifiziert.

Weitere Versuche mit Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid.

Das für die folgenden Versuche verwendete Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid wurde unter besonders sorgfältigen Bedingungen hergestellt (aus N-Carbäthoxysarkosin mit Acetylchlorid und Acetanhydrid nach der schon früher angegebenen Vorschrift⁷). Nach mehrmaligem Umlösen in der üblichen Weise unter P_2O_5 -Abschluß wurde in einer Apparatur, die eine verkehrte Filtration unter Feuchtigkeitsausschluß ermöglichte, anschließend noch 2mal aus Chloroform-Petroläther umgelöst. Nach dem Waschen des Sarkosin-

Tabelle 7. Zersetzung der α -Amino-N-carbon-

Nr.	N-Carbonsäureanhydrid	Gramm	ml Pyridin	Zeit in Tagen	Aufarbeitung	Ausbeuten an äther-löslichem Dioxo-piperazin	Ausbeute an äther-unlöslichem Polymeren
1	D,L-Phenylalanin ..	1,0	10 (II)	1	a	0	quantitativ
2	D,L-Phenylalanin ..	1,0	3 (II)	1	b	0	„
3	N-Äthylglycin	2,8	25 (I)	5	a	Spuren	nicht genau bestimmt
4	N-Isobutylglycin...	1,8	18 (I)	5	a	0,1 g	nicht genau bestimmt
5	N-Cyklohexylglycin	9,3	75 (I)	5	a	2,5 g	nicht genau bestimmt
6	N-Benzylglycin	3,3	27 (I)	5	b	0,22 g	2,15 g
7	N-Benzylglycin	0,209	41,5 (I)	4	a	0,130 g	nicht genau bestimmt
8	N-Phenäthylglycin .	0,7	7 (I)	5	a	Spuren	0,55 g
9	Sarkosin	2,458	25 (I)	5	a	„	1,712 g
10	Sarkosin	5,762	58 (I)	5	b	„	nicht genau bestimmt

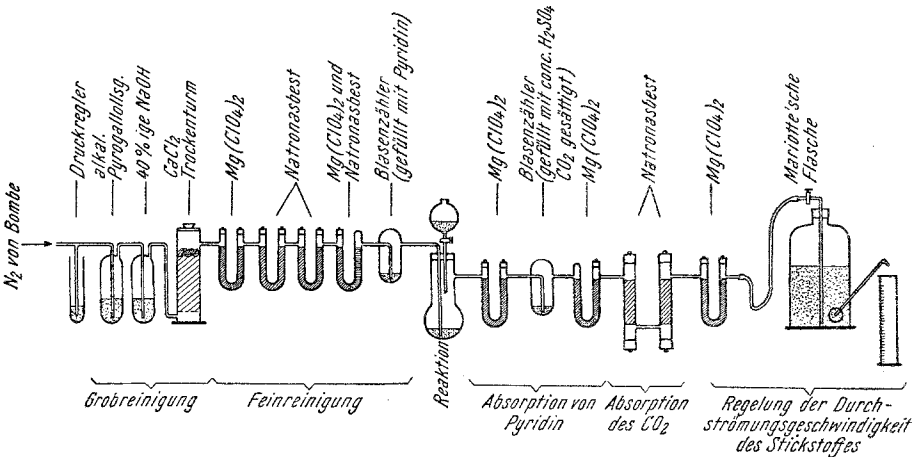


Abb. 1. Apparatur zur quantitativen Bestimmung von aus N-Carbonsäureanhydriden abgespaltenem CO₂.

N-carbonsäureanhydrids mit Chloroform-Petroläther wurde der Kolben von der Apparatur genommen und zusammen mit dem N-Carbonsäureanhydrid in einen vorbereiteten Vakuumexsikkator (gefüllt mit P₂O₅ und Paraffin) gegeben und unter Vorschalten eines P₂O₅-Rohres an der Ölpumpe einige Std. im Dunkeln getrocknet. Die Entnahme von Sarkosin-N-carbon-

säureanhydride mit Pyridin I oder II.

Analysen des Polymerisats				% Pyridin im Polymerisat	Anmerkung
berechnet		gefunden			
C	H	C	H		
73,48	6,17	73,31	6,19	nicht bestimmt	Die Analysen sind für Cyklo-peptide berechnet.
73,48	6,17	73,56	6,21	„ „	
56,5	8,25	56,68	8,74	„ „	
63,7	9,74	63,36	9,62	„ „	Dioxopiperazin fällt aus.
—	—	—	—	„ „	
73,4	6,12	72,32	6,25	„ „	
—	—	—	—	„ „	Zur Analyse wurden alle Polymerisate bei 0,02 Torr und 80 bis 100° C über P ₂ O ₅ einige Stdn. getrocknet.
74,5	6,84	73,71	6,91	„ „	
50,6	7,03	50,25	7,10	4,71	
50,6	7,03	50,95	6,69	0,5	

säureanhydrid aus dem Exsikkator erfolgte unter den gebotenen Vorsichtsmaßnahmen.

Zur Bestimmung der vollkommenen Reinheit des verwendeten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids wurde die thermisch abgespaltene CO₂-Menge gravimetrisch gemessen. Die Bestimmung wurde in einer Apparatur, wie sie Abb. 1 zeigt, und in der auch die Zersetzung mit Pyridin erfolgte, durchgeführt.

Für die *quantitative Bestimmung der CO₂-Menge*, die bei der Einwirkung von Pyridin auf die N-Carbonsäureanhydride entwickelt wird, war es notwendig, auf die Löslichkeit des CO₂ in Pyridin Rücksicht zu nehmen. Dazu wurde vor dem Zersetzungskolben, der in diesem Falle nur mit 5 ml reinstem Pyridin beschickt war, ein Kölbchen mit Tropftrichter und anschließend ein Trockenrohr vorgeschaltet. In das Kölbchen wurde eine genau gewogene Menge reinsten Na₂CO₃ gebracht und aus dem Tropftrichter langsam 10 ml Schwefelsäure (p. A., 1:2 mit Wasser verdünnt) eingetropft. Das CO₂ wurde wie bei den anderen Versuchen durch einen reinen, trockenen N₂-Strom in das vorgelegte Pyridin geleitet und nachher in der Absorptionsapparatur das CO₂ mit Natronasbest aufgefangen und gewogen. Die Durchströmungszeit und die Strömungsgeschwindigkeit wurde bei diesen Versuchen und den eigentlichen Zersetzungsversuchen genau konstant und gleichmäßig gehalten. Die Differenz aus der theoretisch zu erwartenden CO₂-Menge, die sich aus der Einwaage des Na₂CO₃ berechnen läßt, und der wirklich gefundenen CO₂-Menge ergibt die Menge CO₂, die in 5 ml Pyridin bei den gegebenen Versuchsbedingungen gelöst bleibt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 enthalten.

Zur Reinheitsprüfung wurde die in den Zersetzungskolben eingewogene Probe des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids 4 Stdn. auf 130 bis 140° erhitzt, das entwickelte CO₂ durch einen reinen Stickstoffstrom, wie zuerst beschrieben,

Tabelle 8.

Einwaage an Na ₂ CO ₃ in g	Theoretische Menge CO ₂ in g	Gefundene Menge CO ₂ in g	Differenz in g	Differenz in %
0,49831	0,20684	0,20482	0,00202	0,97
0,50769	0,21074	0,20936	0,00138	0,65
0,50033	0,20817	0,20708	0,00109	0,53

in die Absorptionsröhrchen übergeführt und dann gravimetrisch bestimmt. Es wurde bei mehreren Versuchen $100 \pm 0,5\%$ der theoretisch berechneten Menge CO₂ gefunden.

Nun wurde in den Zersetzungskolben zu dem abgewogenen Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid 5 ml reinstes Pyridin zufließen gelassen und die Bestimmung des entbundenen CO₂ wieder gravimetrisch durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2, S. 720 enthalten.

Die Zersetzung dieses reinsten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids wurde sowohl mit Pyridin I als auch mit Pyridin II wie bisher beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich bei Verwendung dieser beiden Pyridinsorten kein Unterschied. Das Reaktionsgemisch wurde entweder nach der Methode a oder b aufgearbeitet. Wir wollen aus der großen Anzahl der Versuche nur zwei folgen lassen, wobei wir gleichzeitig die *experimentelle Bestimmung des eingeschlossenen Pyridins* als Pikrolonat beschreiben.

Methode a: 2,458 g Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid wurden mit 25 ml Pyridin zersetzt; nach 5tägigem Stehen wurde das Pyridin überkonz. Schwefelsäure im Vak. bis zur Gewichtskonstanz entfernt, wobei 1,712 g Rohprodukt erhalten wurden (das sind $0,194 \text{ g} = 12,78\%$ über der theoretisch zu erwartenden Ausbeute von 1,518 g Polymerisat). Durch 4tägiges Extrahieren mit Äther im Soxhlet unter Feuchtigkeitsabschluß wurde eine Gewichtsabnahme erzielt, die auf eine teilweise Entfernung des Pyridins zurückzuführen ist. Die Gewichtsmenge des mit Äther extrahierten Polymerisats betrug 106,61% d. Th. 0,990 g dieses Stoffes wurden nun in 40 ml Wasser gelöst und 4 Tage mit Äther im Schacherl extrahiert. Der Äther wurde abgetrennt und mit alkohol. Pikrolonsäurelösung versetzt; die erhaltenen 0,190 g Pyridinpikrolonat entsprechen 0,0438 g Pyridin. Nach dem Umlösen aus Alkohol schmolzen die gelben Nadeln bei 248 bis 251° (Zers., Vakuumröhrchen, Berl-Block). Pyridinpikrolonat wurde zum Vergleich auch synthetisch hergestellt und hatte dann einen Schmp. von 248 bis 250° (dieselben Bedingungen wie oben).

C₁₅H₁₃O₅N₅ (343,3). Ber. C 52,48, H 3,82, N 20,40.

Gef. C 52,24, H 3,78, N 20,20.

Der Mischschmp. beider Präparate ergab unter den obigen Bedingungen keine Depression.

Durch die Extraktion des in Wasser gelösten Polymerisats mit Äther konnten also nach dem Obigen weitere 0,0438 g Pyridin, das sind 4,71% des Gewichtes des ursprünglichen Polymerisats erhalten werden. Das Gewicht des durch die beiden geschilderten Operationen gewonnenen Stoffes liegt also noch um 1,9% über dem für ein reines Cyklopeptid berechneten.

Methode b: 5,762 g Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid wurden mit 58 ml Pyridin zersetzt, 3 Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen, mit 250 ml absol. Äther gefällt und die weißen Flocken nach dem Absaugen mit absol. Äther

3 Tage im Soxhlet extrahiert. Im Äther befanden sich nur Spuren von Substanz. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie beim obigen Beispiel beschrieben. Aus dem erhaltenen Pyridinpikrolonat errechnete sich ein Pyridingehalt von 0,5%. Die Analysen dieser Polymerisate sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Um ganz sicher zu sein, daß nicht doch ganz geringe Mengen von Wasser die Zersetzung des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids bewirken, wurde eine *Zersetzung im Hochvak.* in der Apparatur der Abb. 2 ausgeführt. Es wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen des Anhydrids in Pyridin gearbeitet und so die Produkte der Tabelle 9 gewonnen, die für die Viskositätsbestimmungen in Alkohol, die elektrophoretischen Messungen und die elektrometrische Titration verwendet wurden.

Tabelle 9.

Präparat-Nr.	Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid in g	ml Pyridin bei 0,5 g Einwaage	Konzentration = Mol Anhydrid pro Mol Pyridin
1	0,47629	2,98	$1,2 \cdot 10^{-1}$
2	0,44012	4,89	$7,2 \cdot 10^{-2}$
3	0,42825	9,42	$3,7 \cdot 10^{-2}$

Die Einwaage des N-Carbonsäureanhydrids wurde durch den seitlichen Ansatz *a* in das vorher im Hochvak. ausgeheizte Reaktionsgefäß *b* gebracht und dieser Ansatz sofort wieder abgeschmolzen. Nun wurde in ein mit dem Reaktionsgefäß durch eine Abschmelzkapillare *c* verbundenes Gefäß *d* durch einen seitlichen Ansatz *e* Bariumoxyd eingefüllt und durch diesen hierauf unter Durchleiten von trockenem Stickstoff trockenes Pyridin eingebracht. Nach Abschmelzen des Ansatzes *e* und Einfrieren des Pyridins über Bariumoxyd durch flüssige Luft wurden die Gefäße erneut bei *f* auf Hochvak. abgepumpt, das Pyridin aufgetaut, um darin gelöste Luft zu entfernen, wieder eingefroren und im Hochvak. beide durch die Abschmelzkapillare *c* verbundenen Gefäße bei *f* abgeschmolzen. Nun wurde vorsichtig das Pyridin zu dem mit flüssiger Luft gekühlten Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid in *b* destilliert und danach die Abschmelzkapillare *c* abgeschmolzen. Das Pyridin wurde nun durch Eintauchen des Reaktionsgefäßes *b* in laues Wasser möglichst rasch aufgetaut, wobei bei Präparat 1 und 3 sofort eine CO_2 -Entwicklung zu bemerken war; bei Präparat 2 trat erst nach einigen Min. eine schwache Gasentwicklung ein. Die Reaktionsgefäße der 3 Versuche wurden in einem Thermostaten durch 13 Stdn. genau auf 20° gehalten, hernach geöffnet und die klare Lösung des Polypeptids in Pyridin in eine Abdampfschale gespült und im Vakuumexsikkator bei 12 mm Hg das Pyridin durch Stehenlassen über konz. Schwefelsäure entfernt. Anschließend wurde das Polymerisat in Alkohol gelöst und durch Eintropfenlassen in die etwa 8fache Menge absol. Äther wieder ausgefällt, abzentrifugiert und über konz. Schwefelsäure

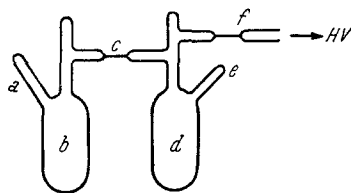


Abb. 2. Apparatur zur Hochvakuumzersetzung des Sarkosin-N-carbonsäureanhydrids.

im Vakuumexsikkator scharf getrocknet. Die ganz schwach bräunlich gefärbten, glasigen Polymerisate zeigten noch einen schwachen Pyridingeruch.

Von den erhaltenen drei Präparaten wurde die Viskosität in Äthylalkohol bei 20° bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, ist die Abhängigkeit des η_{sp}/c von c nicht linear, was die Extrapolation auf die Konzentration Null unmöglich gestaltet. Es läßt sich auch keine Beziehung zwischen Grundviskosität und Molgewicht der erhaltenen Polymerisate angeben. Es ist jedoch durch die stets tiefer liegenden Werte

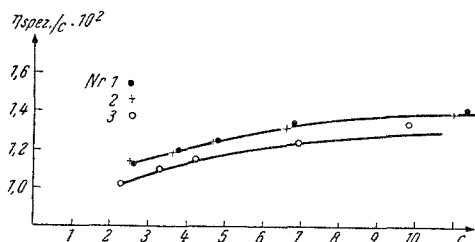


Abb. 3. Viskositäten von Sarkosinpolypeptiden der Tabelle 9 in Alkohol bei 20° C. (Werte in Tabelle 10.)

von η_{sp}/c bei dem Polypeptid des Versuches 3 sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Molekulargewichte der entstandenen Polypeptide mit sinkender Konzentration des N-Carbonsäureanhydrids abnehmen. Eine zahlenmäßige Angabe über die Höhe der Molekulargewichte läßt sich aber nicht machen. Es sei lediglich darauf hingewiesen, daß ein von J. W. Breitenbach

und F. Richter⁹ untersuchtes Sarkosinpolypeptid bei größenordnungsmäßig gleicher Viskosität in Alkohol wie die hier beschriebenen Produkte in Wasser ein osmotisch bestimmtes Teilchengewicht von etwa 6000 zeigte. Die nachfolgende Tabelle 10 enthält die Meßdaten der Viskositätsbestimmungen an den Präparaten der Tabelle 9 (graphische Darstellung in Abb. 3).

Tabelle 10.

Präparat 1: $c = \text{g/l}$	11,40	6,83	4,88	3,80	2,62
η_{sp}	0,158	0,091	0,060	0,045	0,029
$\eta_{sp}/c \cdot 10^2$	1,39	1,33	1,23	1,19	1,12
Präparat 2: $c = \text{g/l}$	11,05	6,62	4,73	3,68	2,55
η_{sp}	0,153	0,087	0,058	0,044	0,029
$\eta_{sp}/c \cdot 10^2$	1,38	1,31	1,24	1,18	1,14
Präparat 3: $c = \text{g/l}$	9,87	5,92	4,23	3,29	2,28
η_{sp}	0,130	0,072	0,048	0,036	0,023
$\eta_{sp}/c \cdot 10^2$	1,32	1,22	1,13	1,09	1,01

Die Werte für die Viskositätsbestimmungen in Wasser von Sarkosinpolymerisaten sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Auch aus diesen Daten zeigt sich, daß die Viskositätswerte für Polymerisate, in konzentrierter Lösung des N-Carbonsäureanhydrids in Pyridin dargestellt, höher sind als für solche, die in verdünnter Lösung dargestellt wurden. Die in Tabelle 11 untersuchten Polymerisate waren nicht unter den extremen Bedingungen wie die Präparate der Tabelle 9 dargestellt worden.

Es wurde ferner versucht, mit Hilfe von Diffusionsmessungen größenordnungsmäßig das Teilchengewicht zu bestimmen. Die Bestimmung der Diffusionskonstanten selbst erfolgte auf Grund der Änderung des Brechungs-

⁹ Makromol. Chem. 4, 262 (1950).

Tabelle 11.

Polymerisat aus g NCSA ml Py.		Nr.	c_v	η_{sp}	η_{sp}/c_v
0,5	1	1	10,113	0,2195	0,0217
			5,0565	0,1062	0,0210
			2,5283	0,0506	0,0200
0,5	2,5	2	10,107	0,1858	0,0184
			5,0535	0,0904	0,01788
			2,5268	0,0437	0,0173
0,5	5	3	10,113	0,1769	0,0175
			5,0565	0,0864	0,01706
			2,5283	0,0407	0,01612
0,5	10	4	10,303	0,1758	0,01706
			5,152	0,0864	0,01675
			2,576	0,0407	0,0158
0,5	25	5	10,094	0,1728	0,0171
			5,047	0,0824	0,01628
			2,5235	0,0397	0,01574
0,5	50	6	10,181	0,1678	0,01648
			5,0905	0,0795	0,01562
			2,5453	0,03878	0,01522
			1,2726	0,0179	0,01405

gradienten mit der Methode der gekreuzten Spalte in der Elektrophorese-apparatur nach *H. Michl*⁵. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch aus 98% Wasser und 2% Pyridin. Die Versuchstemp. war 15°. Berechnet wurde die Diffusionskonstante aus der größten Ordinate und der Fläche der Gradientenkurve¹⁰. Die so erhaltenen Diffusionskonstanten extrapolierten wir auf unendliche Verdünnung und setzten sie, sowie das aus der Viskosität berechnete Achsenverhältnis und das spezifische Volumen in die von *A. Polson*¹¹ angegebenen Gleichungen ein. Die Ergebnisse waren im einzelnen: bei der Sbst. 5 der Tabelle 11 war der Diffusionskoeffizient zeitlich konstant und die Abweichung von der *Gaußschen* Verteilungskurve gering; die Substanz dürfte demnach einen ziemlich einheitlichen Polymerisationsgrad aufweisen. Die Diffusionskonstante betrug $D_{\infty}^{20} = 6,5 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$; nach *A. Polson* errechnete sich eine Teilchengröße von 22000. Die Sbst. 2 der Tabelle 11 dürfte einen wesentlich uneinheitlicheren Polymerisationsgrad haben. Sie zeigt starke Abweichungen vom *Fickschen* Gesetz; die Diffusionskonstante fiel von 9,0 auf $2,3 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$; der Mittelwert lag bei $D_{\infty}^{20} = 4,4 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Analog zum Vorstehenden konnte man daraus Teilchengrößen von 8200 bis 500000 und eine mittlere Teilchengröße von 70000 berechnen. Auffällig war, daß wäßr. Lösungen des Sarkosinpolymerisats einen sehr deutlichen *Tyndall*-Effekt zeigten, während alkohol. Lösungen vollkommen klar waren. Dies und die geringere Viskosität der alkohol.

¹⁰ *H. Neurath*, Chem. Rev. **30**, 357 (1942).¹¹ *A. Polson*, Kolloid-Z. **88**, 51 (1939).

Lösungen könnte man durch eine stärkere Aggregatbildung in der wäßr. Lösung erklären.

Die Stbst. 3 der Tabelle 11 wurde ferner *elektrophoretisch* untersucht. Es war zu erwarten, daß offenkettige Teilchen wegen ihrer polaren Gruppe schneller wandern als cyklische Teilchen gleicher Größe. Die freie Elektrophorese erfolgte in der Apparatur nach *H. Michl*⁵ bei einem Spannungsgefälle von 3,67 V/cm in einem Phosphatpuffer von pH = 7,9 und $\mu = 0,1$. Die Versuchsdauer erstreckte sich auf 5 Stdn. Die quantitative Auswertung ergab:

Beweglichkeit in $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ v}^{-1}$	0,5—1,3	4,7	7,6	12,0
Relat. Konz. der betreffenden Komponente.	97,1%	1,6%	0,8%	0,5%

Die Hauptmenge erweist sich als elektrophoretisch einheitlich und zeigt eine nur sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit. Die schneller wandernden Komponenten dürften offenkettig und von niedrigerem Polymerisationsgrad als die Hauptkomponente sein.

Um exaktere Aussagen machen zu können, wurden auch die im Hochvak. erhaltenen Polymerisate (vgl. S. 731 und 723) der elektrophoretischen Untersuchung unterworfen. Die Untersuchung erfolgte in demselben Phosphatpuffer nach *Sörensen* wie oben angegeben. Die Ergebnisse sind auf S. 723 angeführt.

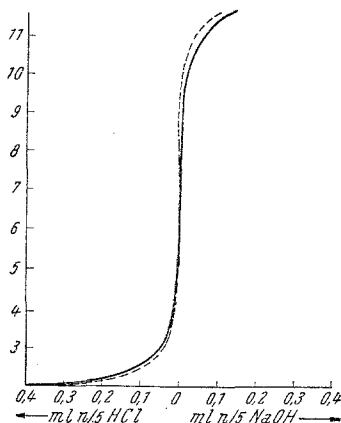


Abb. 4. Elektrometrische Titration von Präparat 2 (-----) und Präparat 3 (—),

Die Stbst. 3 der Tabelle 11 wurde ferner *papierelektrophoretisch* in der Anordnung nach *H. Michl*⁶ untersucht. Als Lösungsmittel diente ein wäßriges Essigsäure-Pyridin-Gemisch nach *H. Michl* mit einem pH = 4,0. Das mittlere Spannungsgefälle war 49,0 V/cm, die Versuchsdauer betrug 1 Std. Auch bei dieser Versuchsanordnung wanderte die Hauptkomponente praktisch nicht. Bei längerer Versuchsdauer ziehen sich die Komponenten stark auseinander,

doch auch dann bleibt die Hauptmenge in der Nähe der Ausgangsstellung.

Elektrometrische Titration von zwei im Hochvak. dargestellten Polymerisaten (Präparate 2 und 3 der Tabelle 9): nach der Durchführung der elektrophoretischen Untersuchungen wurde zur Entfernung des Phosphats dialysiert, im Vak. über P_2O_5 eingetrocknet und 75 mg in 5 ml Wasser gelöst. Zuerst wurde mit 0,2 n HCl bis zu einem pH = 2,0, anschließend mit 0,2 n NaOH bis zu einem pH = 12,0 titriert. Die Messung erfolgte mit einem *Beckman*-pH-Meter Modell G. Die Titrationskurven der beiden Sarkosinpolymerisate zeigen keine Stufen (Abb. 4), die auf eine schwache Säure oder eine schwache Base hindeuten würden. Der Kurvenverlauf entspricht weitgehend dem einer starken Säure mit einer starken Base.

DNP-Sarkosin: Die Umsetzung von Sarkosin mit 2,4-Dinitrofluorbenzol wurde in der üblichen Weise durchgeführt. Aus wenig verd. Methanol umgelöst, wurden gelbe Kristalle vom Schmp. 173 bis 175° erhalten; nicht hygroskopisch, gut löslich in Methanol, Äthanol, Aceton; wenig löslich in Äther, Wasser und Benzol.

$O_9H_9C_6N_3$ (255,2). Ber. C 42,3, H 3,53. Gef. C 42,3, H 3,59.

DNP-Polysarkosin: 0,2002 g Sbst. 4 der Tabelle 11 wurden mit 8 ml Äthanol, 2 ml dest. Wasser, 0,8 g $NaHCO_3$ und 0,4 g DNFB 2 Std. bei Zimmertemp. geschüttelt und anschließend der Alkohol bei tiefer Temperatur im Vak. abdestilliert. Nun versetzt man mit 30 ml Wasser und extrahiert eine Woche lang im Schacherl mit Äther; auch nach dieser Zeit war der Ätherextrakt noch immer gelb gefärbt. Die Ätherextrakte wurden eingedampft, mit konz. HCl 12 Std. unter Rückfluß gekocht, im Vak. zur Trockene gebracht und nach Lösen in ganz wenig Wasser papierchromatographisch auf Sarkosin untersucht: negativ (die Gelbfärbung des Ätherextrakts rührt also nicht von DNP-Sarkosin oder DNP-Polysarkosin her, sondern ausschließlich von Dinitrophenol). Die Abwesenheit von Sarkosin im Ätherextrakt ist somit eindeutig gegeben, da auch gefunden wurde, daß sich DNP-Sarkosin bei 12stündigem Kochen mit konz. HCl teilweise spaltet, was beim DNP-Polysarkosin ebenfalls eintritt.

Die wäßr. Lösung der Ätherextraktion wurde nun mit 10 ml konz. HCl angesäuert und 10mal mit Benzol ausgeschüttelt. Die gelbe benzolische Lösung wurde dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und anschließend an Silicagel + 55% Wasser chromatographiert, mit Benzol nachgewaschen und mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde mit der wäßr. Lösung von der Benzolausschüttelung vereinigt, mit $NaHCO_3$ genau neutralisiert, ein Überschuß von $NaHCO_3$ (11 g) zugegeben, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und im Beckman-Spektrophotometer die Extinktion bei 390 $m\mu$ bestimmt. Sie betrug $E = 0,299$, das entspricht nach Abb. 5 4,45 γ DNP-Sarkosin/ml Lösung, das heißt 0,222% des eingesetzten Polysarkosins liegen als DNP-Sarkosin vor. Dieser Wert dürfte durch noch vorhandene Spuren Dinitrophenol, die nicht vollständig entfernbare sind, nach oben verfälscht sein, der wirkliche Wert dürfte tiefer liegen, also noch weniger DNP-Sarkosingruppen vorhanden sein. Der geringe Wert für freie Aminogruppen im untersuchten Polysarkosinderivat stimmt mit den anderen Versuchsergebnissen bei diesem Polymerisat überein; wir dürfen nach allem schließen, daß bei Verwendung der Hochvakuumpolymerisate praktisch keine Umsetzung erhalten wird.

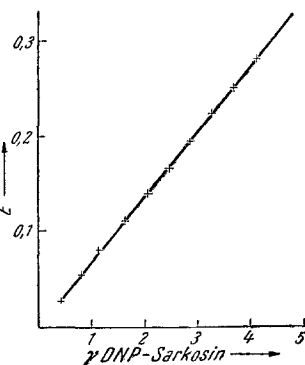


Abb. 5. Eichkurve für DNP-Sarkosin bei Wellenlänge 390 $m\mu$ und dem Salzgehalt des Versuches.

Zersetzung der α -Amino-N-carbonsäureanhydride mit Pyridinderivaten.

Die Ergebnisse mit Ausnahme der mit Nicotinsäureäthylester gewonnenen sind in der Tabelle 12 enthalten.

Die N-Carbonsäureanhydride wurden unter Feuchtigkeitsausschluß mit dem Nicotinsäureäthylester bei Zimmertemp. versetzt und bis zur beendeten Zersetzung stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei den Pyridinzersetzungen auf S. 727 entweder nach Methode a oder b. Die Zersetzungen dauerten bei den verschiedenen N-Carbonsäureanhydriden länger als bei

Tabelle 12.

Nr.	N-Carbonsäureanhydrid	g	Zersetzendes Agens	Zeit	Auf- arbeitung	g äther- unlösliches Polymeres	Analysen ber. für Cyclopeptid C H	Analysen gef. C H	% Zer- setzungs- agens im Polymersi- sat
1	D,L-Phenylalanin ..	1	Chinolin, 3 ml	1 Tag	b	0,69	73,48 6,17	73,47 6,14	
2	" ..	1	Isochinolin, 3 ml	1 "	b	0,66	73,48 6,17	73,38 6,14	
3	" ..	0,1	α -Methoxypyridin, 1 ml	5 Stdn.	a		73,48 6,17	71,30 6,20	6,30
4	Sarkosin	2,03	α -Chlorpyridin, 20 ml	2 Tage	a		50,6 7,03	OCH ₃ 1,79	4,61
5	"	2,03	" 20 "	2 "	b		50,6 7,03	Cl 1,44	1,06
								Cl 0,33	

Tabelle 13.

Nr.	N-Carbonsäureanhydrid	g	NSE (ml)	Zeit	Ausbeute an in g		im Polymerisat		Polymeres löslich in	
					Polym.	Dioxopip.	% OC ₂ H ₅	% NSE	NSE	Äther
1	Glycin	1,4612	15	5 Tage	0,791	0	4,83	16,25	nein	nein
					0,162	0	2,14	7,19	ja	"
2	Sarkosin	1,04	10	5 "	0,835	0,01	5,85	19,63	nein	"
					0,015	0			ja	"
3	N-Cyklohexylglycin	1,00	10	5 "	0,105	0,416	2,48	8,33	"	"
					0,453	0	4,50	15,12	"	ja
4	N-Benzylglycin	0,4	4	5 "	0,328	0	4,05	13,60	nein	nein
5	Phenylalanin	0,4136	4	7 "	0,288	0,02	1,06	3,56	ja	

Verwendung von Pyridin. Die Tabelle 13 orientiert über die erhaltenen Ergebnisse.

Glycin-N-carbonsäureanhydrid: 1,4612 g wurden mit 15 ml Nicotinsäureester bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach 12 Stdn. ist eine gallertige Fällung aufgetreten, während noch Kristalle vorhanden sind und dauernd CO_2 -Entwicklung beobachtet werden konnte. Nach 36 Stdn. reagierte eine entnommene Probe noch stürmisch mit Anilin. Nach 5 Tagen war die Zersetzung beendet. Die Fällung wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen, das weiße Pulver getrocknet und anschließend einen Tag im Soxhlet mit absol. Äther extrahiert. Eine *Zeisel*-Bestimmung dieses Produktes, das sich ab 210° verfärbt und bei 270° noch nicht geschmolzen ist, ergab 4,83% OC_2H_5 . Daraus errechnet sich ein Gehalt von 16,25% Nicotinsäureester. Die Nicotinsäureesterlösung wurde mit dem Waschäther vereinigt und im Vak. von 1 Torr bei einer Maximaltemp. von 120° zur Trockene eingedampft. Nach dem feinen Pulverisieren des Rückstandes wurde er einen Tag lang mit Äther extrahiert und vor der *Zeisel*-Bestimmung bei $78^\circ \text{C}/0,02 \text{ Torr}/\text{P}_2\text{O}_5/6 \text{ Stdn.}$ getrocknet. Es wurden 2,14% OC_2H_5 gefunden, das entspricht einem Nicotinsäureestergehalt von 7,19%. Die weiße Masse schmolz bei 175 bis 180° unter Verfärbung und Zersetzung, nachdem schon bei 150° Sinterung einsetzte. In den Ätherauszügen befanden sich nur Spuren Substanz, deren Aufarbeitung keine wesentlichen Ergebnisse zeitigte.

Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid: 1,04 g wurden mit 10 ml Nicotinsäureester bei Zimmertemp. stehen gelassen; nach kurzer Zeit ist Gasentwicklung in der Lösung zu bemerken und es fällt ein reichlicher weißer Niederschlag aus. Nach 5 Tagen wurde die Fällung abfiltriert und 15 Stdn. mit absol. Äther im Soxhlet behandelt; der ätherunlösliche Anteil wurde 6 Stdn. bei 50 Torr bei Zimmertemp. im N_2 -Strom getrocknet (über P_2O_5). Die Ausbeute betrug 0,835 g Präparat A (theoret. für reines Cyklopeptid ber. Ausbeute 0,642 g). Im Äther befanden sich nur Spuren Substanz. Die *Zeisel*-Bestimmung von Präparat A ergab 5,85% Äthoxyl = 19,5% Nicotinsäureestergehalt. (Zur Kontrolle wurde ein thermisch aus Sarkosin-N-carbonsäureanhydrid erhaltenes Sarkosinpeptid der *Zeisel*-Bestimmung unterworfen und dabei 0,2% Methoxyl gefunden. Die Methylimidgruppierung ist also, wie von vornherein zu erwarten war, gegen diese Behandlung stabil.) Die Hydrolyse von 0,1490 g des Präparats A mit 10 ml konz. HCl ergab ein rein weißes Produkt, dessen Papierchromatogramm sowohl für Sarkosin als auch für Nicotinsäure positiv ausfiel.

Die Nicotinsäureesterlösung wurde bei $100^\circ/0,001 \text{ Torr}$ zur Trockene verdampft und der Rückstand mit Äther extrahiert. Dabei blieben 0,015 g zurück, die nicht weiter untersucht wurden (amorphes Produkt, Polymerisat). Nach Verdampfen des Äthers wurden 10 mg Kristalle erhalten, die im Hochvak. sublimiert wurden; anschließend wurden geringe ölige Verunreinigungen mit Petroläther entfernt und nochmals im Hochvak. sublimiert. Dabei wurden weiße Nadeln vom Schmp. 146° erhalten, die im Mischschmp. mit $\text{N,N}'$ -Dimethyl-2,5-dioxopiperazin keine Schmelzpunktsdepression ergaben.

Es wurde nun versucht, auch mit chemischen Mitteln den eingeschlossenen Nicotinsäureester nachzuweisen. 1,003 g des Polymerisats wurden in 40 ml Wasser gelöst und 10 Stdn. im Schacherl mit Äther extrahiert (0,2 g Nicotinsäureester sind aus 40 ml Wasser innerhalb von 6 Stdn. mit Äther quantitativ herauszuholen). Der Äther wurde abgetrennt und mit NaCl getrocknet; aus dieser Lösung wurde nun durch Zusatz von überschüssiger, alkohol. Pikrolonsäurelösung das Nicotinsäureäthylesterpikrolonat erhalten. Die

Ausbeute betrug 0,390 g = 14,2% Nicotinsäureester im Polymerisat. Das Rohprodukt wurde aus Alkohol umgelöst und der Schmp. zu 168,5° (Zers.) bestimmt. Der Mischschmp. mit synthetisch hergestellter Probe ergab keine Depression. Auch die Analysen ergaben die berechneten Werte. Die nach der Ätherextraktion verbliebene wäßr. Lösung wurde im Vak. zur Trockene eingedampft und im Rückstand noch 0,43% Äthoxyl = 1,43% Nicotinsäureester gefunden. Die Gesamtmenge des gefundenen Nicotinsäureesters betrug also 15,63% des Polymerisats. Es ergibt sich also zum ursprünglichen Zeisel-Wert von 19,5% Nicotinsäureester eine Differenz von nicht ganz 4%, was wir auf die Löslichkeit des Pikrolonats im Alkohol zurückführen.

N-Cyklohexylglycin-N-carbonsäureanhydrid: 1,00 g wurden mit 10 ml Nicotinsäureester 5 Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach kurzer Zeit ist das gesamte N-Carbonsäureanhydrid in Lösung gegangen, nach 2 Tagen beginnt sich die Lösung zu trüben und es ist geringe Gasentwicklung zu bemerken. Die entstandene Fällung wurde abfiltriert und mit Äther gewaschen: Rückstand 0,416 g rein weißer Substanz, fast ausschließlich kristallin. Die Kristalle konnten nach Isolierung und Reinigung mittels Schmp., Mischschmp. und Analyse als das entsprechende Dioxopiperazin identifiziert werden. Im Äther waren noch 0,043 g Substanz enthalten.

Die Nicotinsäureesterlösung wurde bei 0,001 Torr/70° C eingedampft und der Rückstand mit Äther extrahiert; Rückstand 0,105 g mit 2,48% OC_2H_5 , das sind 8,33% Nicotinsäureester. Aus dem Ätherextrakt wurden 0,453 g Substanz mit einem Gehalt von 4,50% Äthoxyl = 15,12% Nicotinsäureester erhalten.

N-Benzylglycin-N-carbonsäureanhydrid: 0,4 g wurden mit 4 ml Nicotinsäureester 5 Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen. Aus der Lösung scheidet sich eine weiße Gallerte aus. Die gesamte Reaktionsmasse wurde mit absol. Äther versetzt, einige Zeit unter öfterem Rühren stehen gelassen, filtriert, mit Äther nachgewaschen, der Äther eingedampft und getrocknet. Unlöslich in Nicotinsäureester und Äther erwiesen sich 0,3280 g weiße Masse (enthält einige Kristalle) mit 4,05% OC_2H_5 , das entspricht 13,6% Nicotinsäureester. Aus der Nicotinsäureester-Äther-Lösung wurden 0,023 g nicht näher untersuchter Substanz erhalten.

Phenylalanin-N-carbonsäureanhydrid: 0,4136 g wurden mit 4 ml Nicotinsäureester versetzt und die sofort erhaltene klare Lösung eine Woche bei Zimmertemp. stehen gelassen. Es konnte nur geringe Gasentwicklung bemerkt werden. Die Reaktionslösung wurde bei 0,3 Torr zur Trockene eingedampft und der amorphe, glasig erstarrte Rückstand 1 Tag im Soxhlet mit absol. Äther extrahiert. Das dabei erhaltene weiße, amorphe, unlösliche Produkt wog 0,288 g. Die Zeisel-Bestimmung ergab 1,06% Äthoxyl, entsprechend 3,56% Nicotinsäureester. Der Ätherextrakt wurde nach dem Abdestillieren des Äthers im Hochvak. destilliert (bis 220°/0,001 Torr), die dabei erhaltenen Kristalle, die durch ölige Produkte verunreinigt waren, wurden durch Umlösen und Sublimation im Hochvak. weiter gereinigt und so erhalten: 20 mg Phenylalaninanhydrid (3,6-Dibenzyl-2,5-dioxopiperazin) vom Schmp. 291 bis 292° und 10 mg kristallisierte Verbindung vom Schmp. 185 bis 188°, deren Konstitution wir nicht weiter untersucht haben, neben geringen Mengen eines Öles.

Darstellung der 2,5-Diketopiperazine.

N,N'-Diäthyl-2,5-dioxopiperazin: 10 g N-Äthylglycin-chlorhydrat, dargestellt nach der Streckerschen Methode⁷, wurden durch Veresterung mit

25 ml absol. Äthanol. Salzsäure in das Esterchlorhydrat übergeführt, aus dem in der üblichen Weise (Pottasche) der freie Ester dargestellt, in Äther übergeführt und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels durch Destillation bei 12 Torr gereinigt wurde.

Aus dem Ester wurde das Dioxopiperazin auf zwei verschiedene Arten dargestellt:

a) 5 g Ester wurden mit der gleichen Menge Wasser versetzt und bei Zimmertemp. stehen gelassen. Es bildet sich im Laufe von Wochen ein großer Kristall, der mit Äther gut gewaschen, pulverisiert und nachher sublimiert wurde (110°/0,015 Torr); dabei wurden stark lichtbrechende, weiße Kristalle vom Schmp. 129° erhalten. Die wäßr. Esterlösung ergab bei weiterem Stehen kleinere Kristalle. Die Gesamtausbeute ist unbefriedigend; diese Methode hätte nur Interesse zur Züchtung besonders schöner und großer Kristalle.

b) Der Ester wurde 36 Stdn. im geschlossenen Rohr auf 180° erhitzt. Die beim Erkalten aus der rötlichbraunen Lösung ausgefallenen Kristalle wurden mit wenig Äther gewaschen und anschließend bei 110°/0,03 Torr sublimiert. Wir kristallisierten aus Äther unter Druck oder aus Aceton-Äther um.

$C_8H_{14}O_2N_2$ (170,2). Ber. C 56,45, H 8,29, N 16,46.

Gef. C 56,43, H 8,35, N 16,64.

N,N'-Diisobutyl-2,5-dioxopiperazin:

N-Isobutylglycin: Wurde entweder nach der Streckerschen Methode⁷ oder durch reduktive Alkylierung¹² dargestellt. Dazu wurden 5 g Glykokoll in 200 ml 50%igem Alkohol, der 10 g Isobutyraldehyd enthielt, suspendiert und bei 15° unter Zusatz von 3 g 10%iger Pd-Tierkohle mit Wasserstoff hydriert, bis die Aufnahme 1660 ml betrug, was nach etwa 4 Stdn. erreicht wurde. Nach der Filtration und Abdampfen des Lösungsmittels wurden durch Behandeln mit absol. Äthanol weiße, glänzende Blättchen erhalten. Die alkohol. Mutterlauge wurde abgedampft, getrocknet, mit 50 ml Benzol extrahiert, filtriert und eingedampft; durch Umlösen aus Alkohol wurde noch eine geringe Menge Aminosäure gewonnen. Die Gesamtausbeute an *N*-Isobutylglycin betrug 4,2 g vom Schmp. 202 bis 203° (Zers.). Äquiv.-Gew. (Willstätter) gef. 133 (ber. 131).

N-Isobutylglycinäthylester: *N*-Isobutylglycin wurde mit der 10fachen Gewichtsmenge absol. Äthanol versetzt und bei 0° bis zur Sättigung trock. HCl-Gas eingeleitet; nach Stehen über Nacht wurde 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht und der Ester auf die übliche Weise aus dem Chlorhydrat in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Sdp. 95°/12 Torr.

N,N'-Diisobutyl-2,5-dioxopiperazin: Diese Verbindung wurde auf verschiedene Weise dargestellt:

a) 0,65 g der Aminosäure wurden mit 5 ml Glycerin 5 Stdn. auf 170 bis 180° erhitzt. Nach Stehen über Nacht wurde mit Wasser verdünnt und mehrfach ausgeäthert. Der Rückstand der Ätherlösung ergab nach der Destillation im Hochvak. unscharf schmelzende Kristalle, die aus Äther unter Druck umgelöst wurden. Sie zeigten dann den Schmp. 140 bis 141°.

b) Durch Erhitzen des Esters im Druckrohr (innerhalb 48 Stdn. von 170° bis auf 200° ansteigend und dann weitere 24 Stdn. bei 200° gehalten). Nach Öffnen der Bombe wurde mit Äther gewaschen und die erhaltenen

¹² R. E. Bowman und H. H. Stroud, J. Chem. Soc. London 1950, 1342.

weißen Kristalle sublimiert, die dann nach dem Umlösen aus Äther unter Druck bei 140 bis 141° schmolzen.

$C_{12}H_{22}O_2N_2$ (226,3). Ber. C 63,68, H 9,80, N 12,38.

Gef. C 63,85, H 9,83, N 12,50, MG. 228 (*Rast*).

Die verschiedenen Präparate erwiesen sich nach der Totalhydrolyse mit konz. HCl papierchromatographisch als identisch und einheitlich.

N,N'-Dicyklohexyl-2,5-dioxopiperazin: 1,01 g N-Cyklohexylglycinäthylester, der in der üblichen Weise aus der Aminosäure dargestellt worden war (Sdp. 113°/14 Torr), wurden im Druckrohr 24 Stdn. auf 190° erhitzt. Das teilweise kristallisierte, dunkelbraun gefärbte Reaktionsprodukt wurde nach Abdestillieren des unveränderten Esters im Wasserstrahlvak. an der Ölpumpe bei 0,05 Torr sublimiert und die erhaltenen Kristalle nach der Behandlung mit Petroläther aus Alkohol umgelöst. Ausbeute 0,12 g, Schmp. 225 bis 228°.

$C_{16}H_{26}O_2N_2$ (278,4). Ber. C 69,05, H 9,35, N 10,08.

Gef. C 69,09, H 9,36, N 10,33.

N,N'-Dibenzyl-2,5-dioxopiperazin: 1,05 g N-Benzylglycinäthylester wurden im Einschlußrohr 3 Tage auf 180° erhitzt und nach der Entfernung des unveränderten Esters bei 12 Torr im Hochvak. destilliert. Nach dem Umlösen des Destillats aus Alkohol wurden weiße Nadeln vom Schmp. 173 bis 173,5° erhalten.

N,N'-Diphenäthyl-2,5-dioxopiperazin: 10 g N-Phenäthylglycinäthylester, der auf die übliche Weise dargestellt wurde und den Sdp. 157°/12 Torr hatte, wurden im Einschlußrohr 60 Stdn. auf 180° erhitzt. Aus der gelblich-roten Lösung schieden sich beim Abkühlen weiße Blättchen ab, die mit Äther gut gewaschen und aus Alkohol mehrmals umgelöst einen Schmp. 206 bis 210° zeigten.

$C_{20}H_{22}O_2N_2$ (322,4). Ber. C 74,5, H 6,88. Gef. C 73,92, H 6,85.

Die C, H-Bestimmungen wurden im mikrochemischen Laboratorium des II. Chemischen Universitätsinstitutes von Herrn Dr. G. Kainz ausgeführt.