

D. Gegenseitige Titer-Stellung von AgNO_3 - und NaOH -Lösungen: Verwendet wurde $n/_{10}$ - AgNO_3 -Lösung; die Lösung wird auf 50–100 ccm gebracht, mit 2-proz. $\text{Hg}(\text{CN})_2$ -Lösung und einigen Tropfen Methylrot versetzt und unter Umschütteln mit $n/_{10}$ - NaOH bis zum Farbschlag titriert.

Verw.: 10 ccm $n/_{10}$ - AgNO_3 . Verbr.: 10.03, 9.96, 10.01 ccm $n/_{10}$ - NaOH . — Verw.: 12 ccm $n/_{10}$ - AgNO_3 . Verbr.: 12.04, 11.95 ccm $n/_{10}$ - NaOH . — Verw.: 16 ccm $n/_{10}$ - AgNO_3 . Verbr.: 15.97, 15.95, 16.01 ccm $n/_{10}$ - NaOH . — Verw.: 25 ccm $n/_{10}$ - AgNO_3 . Verbr.: 25.04, 25.02, 24.98 ccm $n/_{10}$ - NaOH .

Erwähnt sei, obwohl es von keinem praktischen Interesse ist, daß man auch den Titer einer NaOH -Lösung gravimetrisch bestimmen kann durch Wägung der gemäß der Reaktionsfolge aus $\text{NaOH} + (\text{HgCN})_2 + \text{AgNO}_3$ gebildeten AgCN -Menge.

304. M. Bergmann, L. Zervas und H. Köster: Autoracemisation arginin-haltiger Aminosäure-anhydride¹⁾. (Beitrag zur Struktur des Clupeins).

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

(Eingegangen am 8. Juni 1929.)

Das *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin-anhydrid (I) erleidet als freie Base einen so raschen Abfall seines Drehungsvermögens, daß bei 21° schon nach 19 Min. die Hälfte der Aktivität verschwunden ist. Der Verlauf gehorcht dem Gesetz monomolekularer Reaktionen. Die in Tabelle I wiedergegebenen Zahlen wurden mit der Auflösung des Monochlorhydrats²⁾ in der äquimolekularen Menge $n/_{5}$ -Natronlauge erhalten:

Tabelle I.

Zeit in Min.	α gef. (1-dm-Rohr)	$k \cdot 10^{-2}$
0	(-3.71°) ³⁾	
8	-2.84°	3.34
13	-2.33°	3.58
18	-1.91°	3.69
23	-1.62°	3.60
28	-1.37°	3.56
33	-1.15°	3.55
38	-0.96°	3.56
43	-0.79°	3.60
48	-0.67°	3.57
58	-0.47°	3.55
73	-0.27°	3.59

Tabelle II.

Zeit in Min.	beobachtet (1-dm-Rohr)	$k \cdot 10^{-2}$
0	(-1.07°) ⁴⁾	
9	-0.76°	3.80
11	-0.71°	3.73
16	-0.65°	3.11
21	-0.55°	3.17
26	-0.45°	3.33
31	-0.40°	3.17
36	-0.32°	3.35
41	-0.26°	3.45
46	-0.20°	3.65
51	-0.19°	3.39
56	-0.16°	3.39
61	-0.11°	3.73
91	-0.05°	3.37

¹⁾ 27. Mitteilung über Umlagerungen peptid-ähnlicher Stoffe; vergl. hierzu auch M. Bergmann, Naturwiss. **17**, 314 [1929]. — 26. Mitteilung s. Biochem. Ztschr. **203**, 280 [1928].

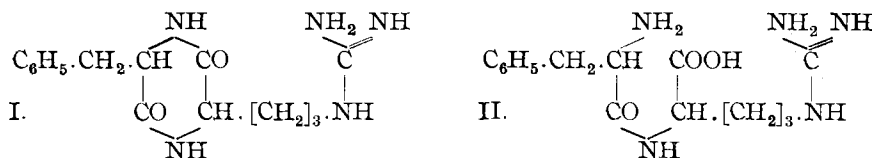
²⁾ Ztschr. physiol. Chemie **173**, 259 [1928].

³⁾ Dieser Anfangswert ist errechnet.

⁴⁾ Der Anfangswert ist errechnet.

Derselbe Versuch in der halben Konzentration und bei 24° durchgeführt ergab $k \cdot 10^{-2} = 3.0$ und eine Halbwertszeit von 23 Min.

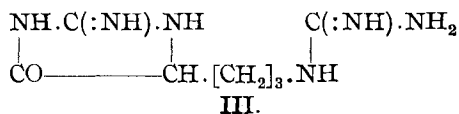
Als wir die Versuchs-Lösung sofort nach vollzogener Autoracemisation aufarbeiteten, isolierten wir ein neues inaktives Phenylalanyl-arginin-anhydrid, in welchem beide Amino-säuren in inaktiver Form vorlagen. Wir haben diesen auffallenden Befund durch Hydrolyse und Untersuchung der erhaltenen Amino-säuren sichergestellt. Läßt man die Lösung des freien, racemisierten Anhydrids jedoch länger stehen, so tritt Selbsthydrolyse unter Dipeptid-Bildung ein.



Die leichte Autoracemisation des Anhydrids I steht in charakteristischem Gegensatz zu unserer Feststellung, daß das entsprechende optische aktive Dipeptid *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin (II), unter entsprechenden Versuchsbedingungen seine optische Aktivität vollständig bewahrt.

Für den Versuch waren 0.2646 g aktives Dipeptid in der äquivalenten Menge $n/5$ -Natronlauge aufgelöst. Die Anfangsdrehung von $\alpha = -6.2^\circ$ (1-dm-Rohr) änderte sich beim Aufbewahren der Lösung während 90 Stdn. (20°) nicht.

Einen zweiten Fall von leichter Autoracemisation haben wir beim *d*- α , δ -Bis-guanido-*n*-valeriansäure-anhydrid (III) beobachtet. Wenn



man nämlich das Dinitrat dieses Anhydrids⁵⁾ in der berechneten Menge $n/5$ -Natronlauge auflöst, so erleidet die in Freiheit gesetzte Base bei 20° einen Drehungsabfall entsprechend Tabelle II, in welcher wir die Konstante k nach der Gleichung einer monomolekularen Reaktion berechnet haben.

Man darf keine bessere Übereinstimmung der Einzelwerte für die Konstante erwarten, weil bei den niedrigen Drehungswerten schon geringe Ablesungsfehler stark ins Gewicht fallen, und weil wegen des raschen Reaktionsablaufs eine mehrmalige Ablesung der einzelnen Drehungswerte kaum möglich ist. Wie man sieht, ist die Reaktionskonstante von derselben Größenordnung wie beim Vorgang der Tabelle I.

Aus dem gegensätzlichen Verhalten der Anhydride I und III einerseits und des Dipeptids II andererseits schließen wir, daß optisch aktive Abkömmlinge des Arginins in wäßriger Lösung eine rasche Autoracemisation erleiden, wenn die α -Aminogruppe und das Carboxyl des Arginins durch Teilnahme an einem Ringsystem verbraucht sind, und wenn außerdem die δ -Guanidogruppe frei ist. Es handelt sich hier um eine Spezialfunktion des Arginins, denn bisher ist bei keinem arginin-freien Diketo-piperazin eine ähnliche Autoracemisation beobachtet worden. Vermutlich handelt es sich um eine intermediäre Tautomerisation der asymmetrisch gebauten Gruppe

⁵⁾ vergl. L. Zervas und M. Bergmann, B. **61**, 1195 [1928].

— CH(R).CO — zu — C(R):C(OH) — unter dem Einfluß der Basizität der freien Guanidogruppe. Eine ähnliche Annahme machen D. H. Dakin für die Racemisation der Hydantoine und P. A. Levene für die Racemisation der Diketo-piperazine unter dem Einfluß von Alkali.

Die bisher bekannt gewordenen Racemisationen von Diketo-piperazinen durch Alkalien verlaufen mit so geringer Geschwindigkeit⁶⁾, daß das Alkali Zeit findet, das Diketo-piperazin hydrolytisch zu spalten unter Dipeptid-Bildung. Dipeptide werden aber noch viel weniger leicht racemisiert als Diketo-piperazine, die optische Verfolgung der Racemisation der Diketo-piperazine wird durch diese Nebenreaktion unübersichtlicher. Bei unseren arginin-haltigen Anhydriden verläuft dagegen die Autoracemisation mit solcher Schnelligkeit, daß sie beendet ist, ehe noch die Autohydrolyse einen erheblichen Umfang angenommen hat. Bergmann und Köster⁷⁾ geben nämlich für die Autohydrolyse des *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin-anhydrids in n_{10} -Lösung bei 20° eine Halbwertszeit von 7 Tagen, bei 37° von 1—2 Tagen an, während die Halbwertszeit der Autoracemisation desselben Stoffes in n_{10} -Lösung bei 24°, wie schon erwähnt, nur 23 Min. beträgt. Unser Verfahren erlaubt also, bei arginin-haltigen Verbindungen aus dem Eintreten oder Ausbleiben der Racemisation zu entscheiden, ob das Arginin in cyclischer Bindung oder in offener Peptidkette vorliegt.

Wir haben dieses Verfahren auf das Clupein angewandt, um damit neue Unterlagen zu bekommen für die grundsätzliche Frage, ob in diesem Protamin anhydrid-artig gebundenes Arginin vorkommt. Falls im Clupein ein beträchtlicher Teil des Arginins in cyclischer Bindung vorhanden wäre, so hätte bei unserer Versuchsmethodik eine schnell verlaufende, teilweise oder völlige Racemisation eintreten sollen. Wir haben also reines, von uns selbst vorbereitetes Clupein-Sulfat mit der auf die Schwefelsäure berechneten Menge n_{10} -Natronlauge gelöst. Aber in derselben Zeit, in welcher beim *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin-anhydrid eine vollständige Racemisation eintrat, war beim Clupein kaum ein Betrag von 5% racemisiert. Die Halbwertszeit betrug für Clupein bei 20° etwa 6 Tage gegenüber 23 Min. bei dem vorgenannten Anhydrid. A. Kossel und F. Weiß⁸⁾ hatten mit überschüssiger Natronlauge bei Zimmer-Temperatur eine Halbwertszeit von 3—4 Tagen gefunden. Die Geschwindigkeit der Racemisation des *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin-anhydrids und des Bis-guanido-valeriansäure-anhydrids auf der einen Seite und des Clupeins auf der anderen Seite sind von so verschiedener Größenordnung, daß man mit hinreichender Sicherheit behaupten kann, im Clupein ist das Arginin nicht in Form einfacher Anhydride vorhanden.

Von den gegenwärtig zur Diskussion stehenden Bindungsformen der Aminosäuren in den Proteinen schließt unser Verfahren für das Clupein die Anhydridform aus und macht damit das Vorliegen von Peptidketten wahrscheinlich, für welche E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und

⁶⁾ Die Racemisation von *l*-Tyrosyl-glycin-anhydrid mit 2 Mol. n_{10} -Natronlauge bei 20° hat eine Halbwertszeit von 11—12 Stdn. Setzt man von Anfang an 2 Mol. Guanidin-Nitrat zu, so steigt die Halbwertszeit auf mehr als 30 Stdn. Dies beweist, daß die freie Guanidogruppe, wenn sie nicht dem zu racemisierenden Diketo-piperazin selbst angehört, keine Racemisation von ähnlicher Schnelligkeit wie in unseren obigen Beispielen zu bewirken vermag.

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **173**, 264 [1928].

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. **59**, 492 [1909].

W. Graßmann⁹⁾ ganz andere Gründe ins Feld führen. Immerhin bleibt der Unterschied zwischen der beständigen Aktivität des Dipeptids *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin und der deutlichen, wenn auch sehr langsam verlaufenden Autoracemisation des Clupeins unter gleichartigen Versuchs-Bedingungen vorerst ungeklärt und beachtenswert.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für die Gewährung von Mitteln zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

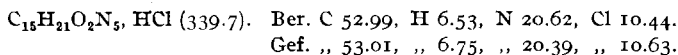
Synthese eines neuen inaktiven Phenylalanyl-arginin-anhydrids durch Autoracemisation.

0.1711 g *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin-anhydrid wurden mit 2.48 ccm $n/5$ -Natronlauge 2 Stdn. bei 20° aufbewahrt und dann mit starker Salzsäure schwach angesäuert (Kongorot). Beim Aufbewahren im Eisschrank schied die Flüssigkeit innerhalb 24 Stdn. 0.10 g des neuen inaktiven Anhydrids als salzsaures Salz in schönen farblosen Tafeln ab. Es läßt sich aus Wasser umkrystallisieren. Das luft-trockene, krystallwasser-haltige Salz schmilzt im Capillarrohr beim raschen Erhitzen gegen 170° unter Aufschäumen, erstarrt dann wieder und schmilzt zum zweitenmal bei 241—243° (korr.) unt. Zers.

Das Krystallwasser ist ziemlich fest gebunden und entweicht bei 56° unter 0.1 mm erst nach etwa 10—15 Stdn. vollständig:



5.315 mg getrocknet. Subst.: 10.330 mg CO₂, 3.205 mg H₂O. — 2.315 mg Subst.: 0.409 ccm N (20°, 753 mm, nach Pregl). — 4.050 mg Subst.: 1.740 mg AgCl.



Ein Gemisch dieses inaktiven Anhydrids mit dem früher beschriebenen inaktiven salzsauren Anhydrid gleichen Namens, das ebenfalls bei 242° schmolz, zeigte starke Schmelzpunkts-Depression und schmolz bei 212°. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um die beiden, nach der Theorie zu erwartenden, inaktiven Stereoisomeren.

Das neue inaktive Anhydrid gibt (wie das früher beschriebene) eine positive, aber sehr schwache Pikrinsäure-Reaktion, mit Kalium-Wismut-Jodid einen krystallisierten, roten Niederschlag, mit Sublimat und Natriumacetat eine starke farblose Fällung. Bei totaler Hydrolyse mit starker Salzsäure erhielten wir *d*, *l*-Phenyl-alanin und *d*, *l*-Arginin.

Autoracemisation des Clupeins.

Wir haben Wert auf die Verwendung eines besonders sorgfältig gereinigten Clupeins gelegt und halten es nicht für überflüssig, seine analytischen Daten anzugeben, weil sie in einigen Punkten etwas von den Angaben der Literatur abweichen. Im großen ganzen haben wir bei seiner Darstellung aus frischer Heringsmilch die bekannte Vorschrift von A. Kossel befolgt.

Das im Exsiccator über Calciumchlorid bei normalem Druck aufbewahrte schwefelsaure Protamin enthielt noch 7.5 % Wasser und nach dem Trocknen nur 0.05 % Asche.

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 156, 68 [1926].

2.210 g Sbst. verloren bei 78° und 0.5 mm über P₂O₅ 0.1667 g an Gewicht. — 5.740 mg getrocknet. Sbst. hinterließen 0.003 mg Asche. 4.455 mg getrocknet. Sbst.: 6.325 mg CO₂, 2.858 mg H₂O. — 5.162 mg Sbst.: 7.355 mg CO₂, 3.255 mg H₂O. — 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 BaSO₄. — 0.1485 g Sbst.: 0.0674 g BaSO₄. — 0.1866 g Sbst.: 0.0852 g BaSO₄.

Gef. C 38.72, H 7.18, N 23.67, H₂SO₄ 19.13.

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

Kossel gab folgende Mittelwerte an¹⁰⁾:

C 37.85, H 6.76, N 25.03, H₂SO₄ 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% H₂SO₄.

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*/₁₀-Natronlauge (statt 2.83 ccm) gelöst und bei 20° aufbewahrt. Die Lösung zeigte 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 Vigneaud¹⁾: Synthese arginin-haltiger Peptide: *d*-Tyrosyl-*d*-arginin und sein Anhydrid²⁾.

[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 α -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

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **25**, 168 [1898].

¹⁾ Fellow National Research Council.

²⁾ 28. Mitteilung über Umlagerungen peptid-ähnlicher Stoffe.