

Die stabilen Kristalle sind meist körnig oder prismatisch und bilden ähnliche Flächenkombinationen wie δ . Häufig liegen sie auf (001), wobei rautenförmige Kristalle mit einem Kantenswinkel von 62° entstehen, die symmetrische Auslöschung und den Austritt einer optischen Achse am Rand des Gesichtsfeldes zeigen. Die Achsenebene ist (010), der Achsenwinkel ist groß, der optische Charakter positiv, die Dispersion $\rho > v$.

Das Auftreten von Modifikationen ist sowohl bei γ - als auch bei δ -Hex. bezüglich der Schmelzpunkts-Bestimmung ohne Belang, z.Tl. wegen der raschen Umwandlung, z.Tl. wegen der geringen Schmelzpunktsdifferenz. Wohl aber zeigen sich Störungen in Zweistoffsystemen mit den anderen Isomeren, die auf die stark verringerte Umwandlungsgeschwindigkeit der instabilen Formen in Mischungen zurückzuführen sind, worüber in einer weiteren Mitteilung berichtet werden soll.

Bezüglich der Gehaltsbestimmung von binären Isomerengemischen sei auf das Verhalten der Brechungsexponenten der Schmelzen hingewiesen.

Bei α -, γ - und δ -Hex. läßt sich die Lichtbrechung der Schmelzen unmittelbar vergleichen, da bei allen dreien das Glaspulver $n_d = 1.5101$ zur Verwendung kommt. Die Gleichheits-Temperaturen betragen für α -Hex. 151° , für γ -Hex. 171° , für δ -Hex. 157° . Die Temperaturdifferenz von 20° macht es bei Gemischen von α - und γ -Hex. möglich, quantitative Bestimmungen auf Grund des Verhaltens der Lichtbrechung mit einer Genauigkeit von $\pm 3\%$ durchzuführen. Bei Gemischen von γ - und δ -Hex. wird infolge der kleineren Differenz (14°) die Genauigkeit geringer; bei α - und δ -Hex. kann wegen der allzu geringen Differenz (6°) diese Methode nicht für quantitative Zwecke benützt werden.

Die für diese Untersuchung verwendeten Präparate wurden uns einerseits von der Chem. Fabrik E. Merck (α -, β -, γ -, δ -Hex.) und andererseits von Hrn. Doz. Dr. R. Riemschneider (α -, β -, γ -, δ -, ε -, ζ -Hex.) in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt, wofür auch hier der verbindlichste Dank ausgesprochen werden soll.

Dem österreichischen Bundesministerium für Handel und Wiederaufbau danken wir verbindlichst für die Unterstützung unserer Arbeiten.

54. Ernst Waldschmidt-Leitz und Karl Kühn: Über einen Weg zur enzymatischen Synthese von Peptiden

[Aus dem Privatlaboratorium München, Kraepelinstraße 2]

(Eingegangen am 3. Januar 1951)

Es wird eine enzymatische Peptidsynthese beschrieben, welche auf einer Verknüpfung von Carbobenzoxy-aminosäure einerseits und Aminosäure-phenylhydrazid andererseits durch Papain beruht; aus dem entstandenen Kuppelungsprodukt wird dann das freie Peptid nach Abspaltung des Carbobenzoxyrestes mittels Jodwasserstoffs und des Phenylhydrazinrestes mittels Cu(II)-Salzes gewonnen.

Eine enzymatische Synthese von Peptiden aus freien Aminosäuren ist aus energetischen Gründen nicht ohne weiteres durchführbar, da es zur Überführung der Aminosäure-Zwitterionen durch Protonenverschiebung in ihre

reaktionsfähige Form einer beträchtlichen Energiezufuhr bedarf¹⁾; im Organismus scheint daher die Synthese mit einem energieliefernden Vorgang, der Spaltung von Adenosintriphosphorsäure, gekoppelt zu sein²⁾. Enzymatische Synthesen von Peptidbindungen sind im Reagensglas nur mit solchen Derivaten von Aminosäuren beobachtet worden, bei welchen einerseits die freie Amino- oder andererseits die freie Carboxygruppe substituiert vorlag³⁾. Eingehendere Untersuchungen über Synthesen mittels Papains haben dann ergeben⁴⁾, daß für die Eignung einer Aminogruppe zur Synthese unter anderem eine bestimmte mäßige Basizität derselben maßgebend ist, entsprechend einer Dissoziationskonstanten von etwa 10^{-9} bis 10^{-10} , in numerischer Übereinstimmung mit den für die Aminogruppen der natürlich vorkommenden α -Aminosäuren ermittelten Konstanten⁵⁾.

Zur Lösung der Aufgabe, eine enzymatische Peptid-Synthese aus Aminosäuren zu erzielen, wird man also von solchen Aminosäure-Derivaten auszugehen haben, die einmal den angeführten Eigenschaften entsprechen und die außerdem der Voraussetzung genügen, daß ihre Substituenten nach vollzogener Synthese der Peptidbindung ohne eine Beeinträchtigung der letzteren wieder abgespalten werden können. Zur Maskierung der freien Aminogruppe erweist sich z. B., wie die Untersuchungen von M. Bergmann⁶⁾ gezeigt haben, der Rest der Benzylesterkohensäure, der Carbobenzyloxy-Rest, als geeignet, der z. B. durch katalytische Hydrierung unter Regenerierung der freien Aminogruppe zerfällt. Als leicht zersetzbare Carboxy-Derivate der Aminosäuren andererseits wären ihre Amide in Betracht zu ziehen, da sie mit Salpêtriger Säure unter Regenerierung des Aminosäurecarboxyls reagieren. Diese sind indessen in der Regel zu stark basisch und nur in solchen Fällen zur enzymatischen Synthese geeignet, in welchen wie bei Tyrosinamid⁷⁾ die Basizität durch einen elektronegativen Charakter der Aminosäure abgeschwächt wird. Die Amide der aliphatischen Aminosäuren sind als Partner der enzymatischen Peptid-Synthese nicht brauchbar; sie treten nicht in Reaktion. Als geeignet erweisen sich dagegen die schwächer basischen Aminosäurephenylhydrazide, mit denen langsam verlaufende Synthesen beobachtet werden, und besser noch ihre Nitroderivate, Mono- und Dinitro-phenylhydrazide, mit welchen, wie wir gefunden haben, entsprechend dem noch stärker abgeschwächten basischen

¹⁾ H. Borsook u. J. W. Dubnoff, Journ. biol. Chem. **132**, 307 [1940]; vergl. E. Waldschmidt-Leitz, Angew. Chem. **61**, 437 [1949] (Diskussionsbemerk. von F. Lyden).

²⁾ Vergl. J. F. Speck, Journ. biol. Chem. **168**, 403 [1947]; W. H. Elliott, Nature **161**, 128 [1948]; P. P. Cohen u. R. W. McGilvery, Journ. biol. Chem. **171**, 89 [1947]; I. D. Frantz u. Mitarb., ebenda **174**, 773 [1948]; K. Bloch, ebenda **179**, 1245 [1949].

³⁾ Vergl. die Zusammenstellung der Ergebnisse von M. Bergmann u. Mitarbb. bei E. Waldschmidt-Leitz, Chemie der Eiweißkörper, Stuttgart 1950, S. 74; S. W. Fox u. C. W. Pettinga, Arch. Biochem. **25**, 13, 21 [1949]; M. Brenner, H. R. Müller u. R. W. Pfister, Helv. chim. Acta **33**, 568 [1950].

⁴⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. K. Kühn, Ztschr. physiol. Chem. **285**, 23 [1949/50].

⁵⁾ Siehe dazu D. M. Greenberg in C. L. A. Schmidt, The Chemistry of the Amino Acids and Proteins, Baltimore (1938), S. 615.

⁶⁾ M. Bergmann u. H. Fraenkel-Conrat, Journ. biol. Chem. **119**, 707 [1937].

⁷⁾ Vergl. M. Bergmann u. O. K. Behrens, Journ. biol. Chem. **129**, 587 [1939].

Charakter die Synthesen rascher verlaufen als mit den einfachen Phenylhydraziden. Die Forderung einer leichten Wiederabspaltbarkeit des Substituenten ist auch bei den Phenylhydraziden der Aminosäuren erfüllt, denn sie zerfallen beim Erwärmen z. B. mit Kupfer(II)-Salz leicht unter Dehydrierung⁸⁾ und Regenerierung der Carboxygruppe.

Als ein gangbarer Weg zur enzymatischen Peptid-Synthese, für den wir im Versuchsteil ein einfaches Beispiel, das der Synthese des Glycyl-glycins, geben, erweist sich so die Reaktion von Carbobenzoxy-aminosäure mit einem Aminosäure-phenylhydrazid, bzw. einem Nitroderivat desselben⁹⁾, unter Mitwirkung von Papain; sie wird ergänzt durch die Wiederabspaltung des Carbobenzoxy-, sodann des Phenylhydrazin-Restes aus dem gebildeten Kuppelungsprodukt und führt so zum Peptid.

Für die Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes bedienen wir uns dabei eines neuen, von den in der Literatur beschriebenen abweichenden Verfahrens: wir bewirken sie durch Einwirkung von Jodwasserstoff in Eisessig rasch und mit guter Ausbeute. Bei der katalytischen Hydrierung der Carbobenzoxy-aminosäure- oder -peptid-phenylhydrazide wird nämlich, wie wir beobachtet haben, häufig zugleich der aromatische Kern des Phenylhydrazins hydriert, in den Nitroderivaten werden außerdem die Nitrogruppen reduziert, welche gegen Jodwasserstoff beständiger sind; auch ist Jodwasserstoff für die Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes der Anwendung anderer dafür in der Literatur empfohlener Reduktionsmittel wie der des schwerer zugänglichen Phosphoniumjodids¹⁰⁾ oder der von Natrium in flüssigem Ammoniak¹¹⁾ in dem vorliegenden Falle vorzuziehen.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

Beschreibung der Versuche

Darstellung von Glycin-phenylhydrazid aus Carbobenzoxy-glycin-phenylhydrazid: 5.0 g Carbobenzoxy-glycin-phenylhydrazid¹²⁾ löst man auf dem siedenden Wasserbad in 20 ccm reinem Eisessig und trägt dann unter Belassung auf dem Wasserbad 45 ccm Eisessig ein, welche etwa 7 g Jodwasserstoff gelöst enthalten (entspr. 2.7–3.0 Mol.)¹³⁾. Die eintretende und durch lebhafte Gasentwicklung gekennzeichnete Reaktion wird zweckmäßig durch Zugabe eines Siedesteinchens beschleunigt; sie ist nach 5–10 Min. beendet. Vom teilweise abgeschiedenen jodwasserstoffsäuren Salz des Glycin-phenylhydrazids wird abfiltriert und der Eisessig i. Vak. bei 30–40° abgedampft; dann nimmt man den Rückstand in Wasser auf und vereinigt die wäbr. Lösung mit der des abfiltrierten und mit Äther gewaschenen jodwasserstoffsäuren Salzes. Die wäbr. Lösung

⁸⁾ Siehe dazu J. Houben, Die Methoden der Organ. Chemie, Leipzig 1925, Bd. I, S. 196 usw.

⁹⁾ Syntheseversuche mit Nitrophenylhydraziden werden wir demnächst veröffentlichen. ¹⁰⁾ C. R. Harington u. T. H. Mead, Biochem. Journ. **29**, 1602 [1935].

¹¹⁾ R. H. Sifferd u. V. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. **108**, 753 [1935]; H. S. Loring u. V. du Vigneaud, ebenda **111**, 385 [1935].

¹²⁾ Dargestellt aus Carbobenzoxy-glycin und Phenylhydrazin durch enzymatische Synthese mittels Papains nach M. Bergmann u. H. Fraenkel-Conrat, Journ. biol. Chem. **119**, 707 [1937].

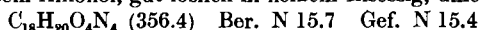
¹³⁾ Lösung bereitet durch Einleiten von gasförmigem Jodwasserstoff (aus Jod und Phosphor) bis zur Aufnahme der gewünschten Gewichtsmenge.

wird nach mehrmaligem Ausschütteln mit peroxydfreiem Äther zur Entfernung beigemengten Benzyljodids i. Vak. zur Trockne eingedampft, der schwach gelblich gefärbte Rückstand in Alkohol aufgenommen und nach dem Abfiltrieren von ungelöst zurückbleibenden Verunreinigungen wiederum i. Vak. bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Die vollständige Abscheidung des Reaktionsproduktes bewirkt man dann durch Zugabe von Äther; Ausb. 4.5 g Rohprodukt entspr. 90% der Theorie. Die Reinigung durch Umfällen aus Alkohol mit Äther liefert farblose Kristalle, welche sich bei 215–220° zersetzen; leicht löslich in Wasser und Alkohol, mäßig löslich in Eisessig, unlöslich in Äther.

0.0954 g verbr. bei der Titration in alkohol. Lösung 1.61 ccm 0.2*n* Lauge statt der ber. 1.63 ccm.

Enzymatische Synthese von Carbobenzoxy-glycyl-glycin-phenylhydrazid: Ansatz: 405 mg Carbobenzoxy-glycin + 570 mg jodwasserstoffsäures Glycin-phenylhydrazid + 52 mg Cystein-HCl·H₂O, durch Zugabe von *n* Lauge (etwa 2.4 ccm) auf p_H = 5.0 eingestellt, + 5.4 ccm Papainlösung¹⁴⁾ + 10.0 ccm 0.1 *M* Citratpuffer von p_H = 5.0; Gesamtvolumen 27.0 ccm, bei 37° in Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

Nach 40 Tagen wurden 370 mg abgeschiedenes Rohprodukt abfiltriert und durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt. Farblose Oktaeder vom Schmp. 161–162° (unkorr.)¹⁵⁾, mäßig löslich in heißem Alkohol, gut löslich in heißem Eisessig, unlöslich in Äther.



Darstellung von Glycyl-glycin aus Carbobenzoxy-glycyl-glycin-phenylhydrazid: Die Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes mittels Jodwasserstoffs in Eisessig nahm man, wie oben (S. 383) beschrieben, vor; man erhielt so aus 4.6 g Carbobenzoxy-glycyl-glycin-phenylhydrazid 4.5 g jodwasserstoffsäures Glycyl-glycin-phenylhydrazid, d. i. 98% der theoret. Ausbeute. Zur Kristallisation des letztgenannten war wiederholtes Anreiben mit trockenem Äther erforderlich. Leicht gelblich gefärbte, hygroskopische Kristalle, welche sich gegen 100° zersetzen.

0.1712 g frisch getrocknete Subst. verbr. bei der Titration in alkohol. Lösung 2.48 ccm 0.2 *n* Lauge statt der ber. 2.45 ccm.

Aus der wäßr. Lösung von 2.0 g jodwasserstoffsäuren Glycyl-glycin-phenylhydrazids fällt man das Jod durch Zusatz von Bleiacetat, das überschüss. Blei wiederum mit Schwefelwasserstoff. Die durch Kochen vom Schwefelwasserstoff befreite Lösung ließ man langsam in eine auf 95° erwärmte Lösung von 3.5 g Kupferacetat in 150 ccm Wasser einfließen und beließ dann noch etwa 10 Min. bei dieser Temperatur; in die von abgeschiedenem Kupfer(I)-oxyd abgesaugte tiefblaue Lösung leitete man zur Ausfällung des Kupfers in der Wärme Schwefelwasserstoff ein und filtrierte nach kurzem Aufkochen vom Kupfersulfid ab. Aus dem i. Vak. bis zu einem kleinen Volumen eingeengten klaren Filtrat fällt man dann das Glycyl-glycin mittels Alkohols; Ausb. 0.50 g entspr. 67% der Theorie.

Die Verbindung erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit Glycyl-glycin und insbesondere nach ihrem Verhalten bei eindimensionaler Papierchromatographie in Phenol-Wasser als einheitlich (z. B. R_F-Wert = 0.56 und 0.57 gegenüber dem in der Literatur¹⁶⁾ angegebenen Werte von 0.58).

¹⁴⁾ Bereitung der Papainlösung: 112.5 mg Papain-Merck, enthaltend 70 Papain-Einheiten, in 12.5 ccm 0.05 *m* Citratpuffer von p_H 5.0 gelöst und filtriert.

¹⁵⁾ Durch Umsetzung von Carbobenzoxy-glycylchlorid mit jodwasserstoffsäurem Glycin-phenylhydrazid dargestelltes Produkt zeigte den nämlichen Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt.

¹⁶⁾ F. Wessely, K. Riedl u. H. Tuppy, Monatsh. Chem. 81, 861 [1950].