

non-(1.2) (II, R = CH<sub>3</sub>) vom Schmp. 191–193° erhalten (64.3%). Zur Analyse wurde aus wenig Essigester umkristallisiert: Schmp. 195–196°.

C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (314.3) Ber. C 80.24 H 4.49 OCH<sub>3</sub> 9.83 Gef. C 80.42 H 4.67 OCH<sub>3</sub> 10.19  
Mol.-Gew. 313.0 (nach Sucharda-Bobranski mit Benzol)

Das gleiche Produkt wurde durch Methylierung von 0.3 g 4-[2-Oxy-naphthyl-(1)]-naphthochinon-(1.2) (II, R = H) (Darstellung vergl. <sup>4</sup>) in 20 ccm 5-proz. methanol. Natronlauge mit 1.5 ccm Dimethylsulfat erhalten. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehengelassen, mit Wasser verdünnt und mit Benzol extrahiert. Rückstand aus Essigester: 0.1 g, Schmp. 193–195°. Misch-Schmp. 195–196°.

Acetylierende Reduktion: 0.1 g des *o*-Chinons II (R = CH<sub>3</sub>) wurde mit einem Gemisch aus 1 ccm Acetanhydrid, 0.5 g Zinkstaub und einem Tropfen Triäthylamin 2 Stdn. auf dem Wasserbade erhitzt, dann in Wasser gegossen und mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand aus der Chloroformlösung kristallisierte beim Anreiben und wurde aus Alkohol umkristallisiert: farblose Nadeln vom Schmp. 153–155°, Ausb. 0.8 g.

C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> (400.4) Ber. C 74.97 H 5.04 OCH<sub>3</sub> 7.74, 2 Acetyl 21.48  
Gef. C 75.07 H 5.16 OCH<sub>3</sub> 8.09, Acetyl 21.22

Phenazinderivat: Ein Gemisch aus 0.1 g *o*-Chinon II (R = CH<sub>3</sub>), 0.039 g Phenylendiamin und 15 ccm Eisessig wurde etwa 20 Min. auf dem Wasserbade erwärmt. Beim Abkühlen schied sich eine gelbe, kristalline Substanz aus, die nach Umkristallisation aus Alkohol bei 207–208° schmolz. Ausb. 0.12 g.

C<sub>27</sub>H<sub>18</sub>ON<sub>2</sub> (386.4) Ber. N 7.25 Gef. N 7.08

Das Oxy-phenazin-Derivat (Darstellung vergl. <sup>5</sup>) lieferte mit äther. Diazomethanolösung i. Ggw. von Methanol den gleichen Methyläther.

## 92. Hans Brockmann und Hans Musso: Versuche zur Synthese von Polypeptiden durch Kondensation von Aminosäure- und Peptidestern, I. Mittel.

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 22. Februar 1954)

Um Bedingungen zu ermitteln, unter denen sich die Methyl ester von Aminosäuren und Peptiden zu mittelgroßen Polypeptiden kondensieren lassen, wurde die Kondensation der Methyl ester von Glycin, *d.l.*-Alanin, *d.l.*-Serin und Tetra-glycin untersucht. Mit geeigneten Lösungsmittel-Systemen ließ sich der Kondensationsverlauf papierchromatographisch verfolgen.

Die Synthese höherer Polypeptide mit etwa fünfzehn bis zwanzig Aminosäureresten, wie sie für viele Modellversuche von Interesse sind, stößt auf folgende prinzipielle Schwierigkeit: Allen bisher bekannten Verfahren zum Aufbau einheitlicher Peptide, einerlei ob sie einzelne Aminosäuren oder Di- bzw. Tripeptide als Bauelemente verwenden, ist gemeinsam, daß die Verlängerung der Kette stufenweise in getrennten Arbeitsgängen erfolgt. Das mit wachsender Kettenlänge immer kostbarer werdende Material dient also bei jedem neuen Arbeitsgang als Ausgangsmaterial für einen Kupplungsprozeß, der keineswegs quantitativ verläuft; der dadurch bedingte Materialverlust wird von Stufe zu Stufe schwerer tragbar. Polypeptide mit etwa zwanzig Aminosäurebausteinen auf diesem Wege aufzubauen, ist mit den modernen Methoden der Peptidsynthese zwar grundsätzlich möglich, praktisch aber mit einem ungewöhnlich großen Aufwand verbunden. Um mittelgroße, aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaute Peptide in einer für größere Versuchsergebnisse ausreichenden Menge zu gewinnen, wird man vorerst nach anderen, besser gangbaren Wegen suchen müssen. Sie sind vorgezeichnet durch die in den letzten Jahren beschrie-

benen Synthesen zahlreicher Polyaminosäuren<sup>1</sup>), bei denen reaktionsfähige Aminosäure-derivate als Ausgangsmaterial dienen.

Gelingt es, solche Polykondensationen auch mit Peptiden durchzuführen, die aus mehreren, verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, so eröffnet sich ein Weg zu höhermolekularen Polypeptiden, in deren Kette sich ein bestimmtes Aminosäuremuster periodisch wiederholt, zu Verbindungen also, die den Polypeptidketten der Proteine immerhin ähnlicher sind als die einförmigen Ketten der Polyaminosäuren.

Von den verschiedenen Verfahren, mit denen sich die Carboxy-Gruppe der Aminosäuren so umformen läßt, daß kondensationsfähige Derivate entstehen, kommen nur wenige für die Übertragung auf Peptide in Betracht. Eines davon ist die Veresterung mit Methanol. Sie hat den großen Vorteil, unter milden Bedingungen und mit guter Ausbeute zu verlaufen.

Versuche, Peptid-methylester analog den Aminosäure-estern zu höheren Polypeptiden zu kondensieren, hat zuerst E. Fischer durchgeführt<sup>2</sup>). Er erhielt durch Erhitzen von Triglycin-methylester neben höhermolekularen Produkten den Hexaglycin-methylester und aus *d,l*-Alanin-glycyl-glycin-methylester neben Hexapeptid-methylester ein Gemisch höhermolekularer Polypeptidester.

Neuerdings hat man diese Versuche wieder aufgegriffen<sup>3</sup>) und dazu außer den beiden eben genannten Methylestern auch den des *d,l*-Leucyl-glycyl-glycins herangezogen. Längeres Erhitzen der Ester lieferte ein Gemisch wenig definierter, höhermolekularer Peptide. Einem aus *d,l*-Alanin-glycyl-glycin-methylester erhaltenen Produkt (Mol.-Gew. 1300) hat man eine cyclische Struktur zugeschrieben<sup>4</sup>).

Wir sind seit einiger Zeit mit Versuchen zur Kondensation von Aminosäure- und Peptidestern beschäftigt, deren Ziel es ist, die Reaktion bei niedrigen Kondensationsgraden abubrechen und das so erhaltene Gemisch mittelgroßer Polypeptide auf einheitliche Verbindung hin aufzuarbeiten; ein Vorgehen, das erst sinnvoll geworden ist, seit in der Elektrophorese, Gegenstromverteilung sowie der Verteilungs- und Ionenaustausch-Chromatographie Verfahren zur Trennung von Peptidgemischen zur Verfügung stehen.

Um die Kondensationsbedingungen von Aminosäure- und Peptidestern kennenzulernen, haben wir zunächst Modellversuche mit den Methylestern des Glycins, *d,l*-Alanins und *d,l*-Serins durchgeführt, über die im folgenden berichtet wird.

Die Kondensation des Glycin-methylesters hat zuerst Th. Curtius<sup>5</sup>) untersucht. Er fand, daß der Ester bei 20° innerhalb einiger Tage zu einer kristallinen Masse erstarrt, die aus Tetraglycinester („Biuretbase“) und Glycin-anhydrid besteht. Die Kondensation des zunächst entstehenden Diglycin-methylesters kann also, wie vorausszusehen, sowohl intramolekular als auch intermolekular weitergehen. Welcher Weg bevorzugt wird, hängt von den Reaktionsbedingungen ab. Anwesenheit von Wasser begünstigt die Cyclisierung zum Glycin-anhydrid, Ausschluß von Feuchtigkeit dagegen verhindert sie fast ganz und läßt die Bildung des Tetrapeptidesters in den Vordergrund treten. Lineare Kondensation unter Bildung von amorphen Polyglycinen aus etwa 100 Glycin-Resten tritt ein, wenn Lösungen des Glycin-methylesters längere Zeit bis 130° erhitzt werden<sup>6</sup>).

*d,l*-Alanin-äthylester reagiert träger als Glycin-methylester. Nach wochenlangem Aufbewahren bei 20° sowie nach Erhitzen auf höhere Temperaturen erhielt E. Fischer<sup>7</sup>)

<sup>1</sup>) E. Katchalski, *Advances Protein Chem.* **6**, 123 [1951].

<sup>2</sup>) E. Fischer, *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **37**, 2486 [1904]; **39**, 2893 [1906].

<sup>3</sup>) E. Pacsu u. E. J. Wilson, *J. org. Chemistry* **7**, 117, 126 [1942].

<sup>4</sup>) G. Schramm u. G. Thumm, *Ztschr. Naturforsch.* **3 b**, 218 [1948].

<sup>5</sup>) Th. Curtius, *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **16**, 753 [1883]; **37**, 1284 [1904]. Th. Curtius u. F. Goebel, *J. prakt. Chem.* **37**, 150 [1888].

<sup>6</sup>) M. Frankel u. E. Katchalski, *J. Amer. chem. Soc.* **64**, 2265 [1942].

<sup>7</sup>) E. Fischer, *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **34**, 433 [1901]; **39**, 453 [1906].

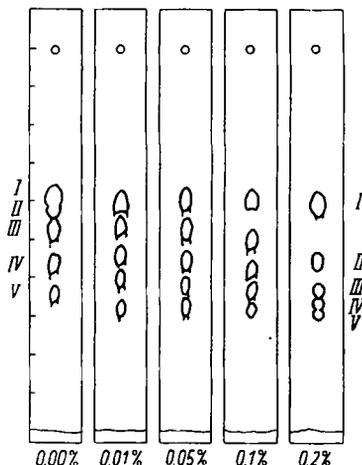
aus *d,l*-Alanin-methylester Reaktionsprodukte, aus denen allein Alanin-anhydrid (bis zu 82% d.Th.) isoliert werden konnte. Später jedoch kamen M. Frankel und E. Katchalski<sup>8)</sup> durch längeres Erhitzen von *d,l*-Alanin-äthylester auf 150° (unter Absaugen des freiwerdenden Alkohols) mit Ausbeuten bis zu 10% d.Th. zu Alaninpeptiden, die maximal etwa 23 Alaninreste enthielten.

Die Kondensation des *d,l*-Serin-methylesters ist unseres Wissens nur von E. Fischer<sup>9)</sup> untersucht worden. Sie lieferte lediglich die beiden stereoisomeren Serin-anhydride.

### I. Papierchromatographische Trennung von Glycin-, Alanin- und Serinpeptiden

Da es uns darauf ankam, die Aminosäureester unter milden Bedingungen zu kondensieren, und dabei nur niedrigmolekulare Polypeptide zu erwarten waren, lag es nahe, den Reaktionsverlauf papierchromatographisch zu verfolgen. Über die papierchromatographische Trennung von Glycin-, Alaninpeptiden und Serinpeptiden sowie ihrer Ester war zu Beginn unserer Untersuchungen nichts bekannt<sup>10)</sup>. Wir haben sie zunächst bei den Glycinpeptiden untersucht.

Wie bereits kurz mitgeteilt<sup>10)</sup>, lassen sich die Glycin-peptide vom Di- bis zum Hexapeptid mit Phenol als mobiler Phase trennen. Die Zonen des Tetra-, Penta- und Hexa-glycins sind dabei gut voneinander abgesetzt, während sich die des Di- und Tripeptides berühren. Die Zonen des Glycins und Diglycins dagegen überlappen sich zum großen Teil. Trotzdem kann man Glycin neben Diglycin gut erkennen, da beim Entwickeln mit Ninhydrin der Glycinfleck zuerst erscheint. Die  $R_F$ -Werte der Glycin-peptide nehmen mit steigender Zahl der Glycinreste zu. Eine völlige Trennung aller Peptide und des Glycins erreicht man mit Phenol-Ammoniak (Abbild. 1). Sie gelingt auch mit Kresol, wobei allerdings die Laufzeit der mobilen Phase auf etwa 330 Stdn. verlängert werden muß<sup>11)</sup>.



Abbild. 1. Papierchromatogramme von Glycin (I), Diglycin (II) bis Pentaglycin (V) mit wassergesättigtem Phenol, wobei die wäßrige Phase steigende Mengen Ammoniak (%) unter den Streifen enthält. Papier: Whatinan Nr. 1; 22–24 Stdn.; 20°.

<sup>8)</sup> M. Frankel u. E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. **64**, 2268 [1942].

<sup>9)</sup> E. Fischer u. U. Suzuki, Ber. dtsch. Chem. Ges. **38**, 4173 [1905].

<sup>10)</sup> H. Brockmann u. H. Musso, Naturwissenschaften **38**, 11 [1951]. Im Laufe unserer Versuche sind auch von anderen Autoren Lösungsmittelgemische zur Trennung der Glycinpeptide angegeben worden: F. Wessely, K. Riedl u. H. Tuppy, Monatsh. Chem. **81**, 861 [1950]; A. H. Cook u. A. L. Levy, J. chem. Soc. [London] **1950**, 646; K. Heyns u. G. Anders, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **287**, 1 [1951].

<sup>11)</sup> Nach A. J. Virtanen u. J. K. Miettinen, Acta chem. scand. **3**, 459 [1949], wurde dabei die mobile Phase am unteren Ende des Streifens durch einen Filtrierpapierbausch aufgesogen.

Um mit diesem Verfahren den Kondensationsverlauf des Glycin-methyl-esters zu verfolgen, muß man die entstandenen Peptidester zunächst verseifen, ohne dabei die Peptidbindungen anzugreifen. Das erreicht man durch 20 Min. lange Behandlung mit  $0.2n\text{Ba}(\text{OH})_2$  bei  $20^\circ$ . Diese Verseifung erübrigte sich, als es uns gelang, auch die Ester der Glycinpeptide papierchromatographisch zu unterscheiden. Mit Butanol-Eisessig als mobiler Phase lassen sich die Glycinpeptide vom Di- bis Hexaglycin sowie ihre Ester gut voneinander trennen. Die in diesem System auf zwei verschiedenen Papiersorten erhaltenen  $R_F$ -Werte und damit auch die Reihenfolge der Zonen zeigt Tafel 1. Glycin und Diglycin sind mit Butanol-Eisessig nicht trennbar. Das ist für die Kontrolle der Glycinester-Kondensation insofern bedeutungslos, als der Diglycin-methylester sehr schnell unter Bildung von Glycin-anhydrid

Tafel 1.  $R_F$ -Werte\*) der Glycinpeptide und der Peptidester bei verschiedenen Papieren und Lösungsmitteln

	Butanol-Eisessig- $\text{H}_2\text{O}$ 4 : 1 : 5		Phenol- $\text{H}_2\text{O}$ ges.		Phenol-ges. mit 0.5 % wässrig. $\text{NH}_3$ 2043 b**)
	Whatm. 1	2043 b**)	Whatm. 1	2043 b**)	
Glycin .....	0.179	0.172	0.38	0.37	0.39
Diglycin .....	0.178	0.173	0.40	0.37	0.53
Triglycin .....	0.152	0.153	0.44	0.43	0.59
Tetraglycin .....	0.118	0.130	0.54	0.52	0.64
Pentaglycin .....	0.085	0.106	0.61	0.60	0.69
Hexaglycin .....	—	0.084	0.70	0.68	—
Tetra-gly-methyl-ester ...	0.247	0.238	—	—	—
Penta-gly-methyl-ester ..	—	0.193	—	—	—
Hexa-gly-methyl-ester ...	—	0.161	—	—	—

\*) Mittelwerte aus über 50 Chromatogrammen.

\*\*) Schleicher & Schüll.

Die Quotienten der  $R_F$ -Werte variieren mit der Papiersorte, ein Hinweis, daß die Papierchromatographie der mit Wasser begrenzt mischbaren Lösungsmittel kein reiner Verteilungsvorgang ist, denn bei verschiedenen Papieren dürfte nur das Verhältnis: Menge der stationären Phase / Menge der mobilen Phase verschieden sein, und dieses müßte alle  $R_F$ -Werte um den gleichen Faktor ändern.

oder höheren Glycin-peptiden weiter reagiert und daher kaum unter den Kondensationsprodukten zu erwarten ist. Dagegen ist der Nachweis von Glycin wichtig, um festzustellen, ob unverändertes Ausgangsmaterial vorhanden ist. Wie wir fanden, läßt sich Glycin von den Glycinpeptiden und ihren Estern mit Isopropanol-Wasser oder auch mit *tert.*-Butanol-Wasser abtrennen. Der Nachweis des Glycins kann im zweidimensionalen Chromatogramm (Abbild. 2) erfolgen, oder besser in zwei nebeneinander laufenden Chromatogrammen mit Butanol-Eisessig bzw. Isopropanol-Wasser.

Die bei der Esterkondensation entstehenden, mit Ninhydrin nicht nachweisbaren Aminosäure-anhydride, werden als orangefarbene Flecken sichtbar, wenn man die Chromatogramme mit stark verdünnter alkalischer Pikrinsäure-Lösung besprüht und 7 Min. bei  $115-120^\circ$  trocknet.



Auch in Äther, Chloroform, Benzol, Dioxan und Tetrahydrofuran war Tetraglycin-methylester das Hauptprodukt; daneben fanden sich Glycin-anhydrid und in kleiner Menge Penta- und Hexaglycin-methylester. Die Kondensation verläuft hier also praktisch genau so wie ohne Lösungsmittel. In Wasser, Methanol und Äthanol dagegen entstand schnell und zu mehr als 90% d.Th. Glycin-anhydrid und in geringer

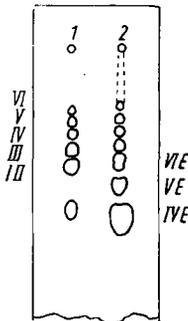


Abb. 3. Papierchromatogramm eines normalen Kondensationsproduktes des Glycin-methylesters mit Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5. 1) Testgemisch aus Glycin bis Hexaglycin, 2) Kondensationsprodukt (V E, VI E, Penta- bzw. Hexaglycin-methylester).

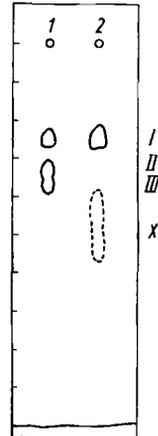


Abb. 4. Papierchromatogramm des kondensierten Alanin-methylesters mit Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5. 1) Testgemisch aus Alanin, Dialanin (II) und Trialanin (III). 2) Kondensationsprodukt. X sehr schwacher Fleck der höheren Alaninpeptidester und Peptide.

Menge Di- bis Hexaglycin. Hydroxylhaltige Lösungsmittel begünstigen also ausgesprochen die Anhydridbildung.

Die Kondensation des Alanin-methylesters erfolgte wie beim Glycinmethylester 1. ohne Lösungsmittel, 2. in absol. Methanol und 3. in Wasser. Die papierchromatographische Untersuchung der nach 6 Monaten gebildeten Reaktionsprodukte zeigte, daß in der wäßr. Lösung lediglich Verseifung eingetreten war, während sich in Methanol neben wenig Alanin nur Alanin-anhydrid gebildet hatte. Auch das Reaktionsprodukt des reinen Esters bestand fast ausschließlich aus Alanin-anhydrid; als Nebenprodukte ließen sich Alanin und sehr kleine Mengen Alaninpeptide nachweisen. Bei allen Versuchen hatte also die intramolekulare Kondensation des zunächst entstandenen Dialanin-methylesters den Vorrang vor der linearen, die sich aber immerhin papierchromatographisch erkennen läßt (Abb. 4).

Das für die Kondensationsversuche mit Serin-methylester erforderliche Serin wurde zunächst nach I. L. Wood und V. du Vigneaud<sup>12)</sup> hergestellt. Gewisse Abwandlungen des Verfahrens (Ersatz des Natriumäthylates durch Natriummethylat und vorsichtige Ätherspaltung) erhöhten die Ausbeute an umkristallisiertem Serin auf 52–59% d. Theorie. Wie wir fanden, läßt sich als Ausgangsmaterial statt Methyl-acrylat recht gut auch Acryl-

<sup>12)</sup> J. biol. Chemistry **134**, 413 [1940].

nitril verwenden. Ob man das dabei als Zwischenprodukt auftretende  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxypropionitril zuerst verseift und dann aminiert oder direkt aminiert, hat auf die Serinausbeute (43% d.Th.) keinen Einfluß. Die Aufarbeitung und Reinigung war einfacher, wenn vor der Aminierung verseift wurde.

Das mit Methanol-Salzsäure erhaltene Serin-methylester-hydrochlorid-Schmp. 132–133<sup>13</sup>), wurde mit Alkoholat in den Ester übergeführt, der ohne weitere Reinigung allein und in verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser, Methanol, Äther, Chloroform, Dioxan und Pyridin) mehrere Wochen bei 20° aufbewahrt wurde. Der Hauptteil des dabei schnell sich abscheidenden Kondensationsproduktes bestand bei allen Ansätzen aus Serin-anhydrid, neben dem in kleiner Menge Serin und Serin-methylester nachzuweisen waren. Unter gleichen Bedingungen in Formamid, Butylamin und Äthylendiamin aufbewahrt, lieferte Serinester ausschließlich Serin-anhydrid.

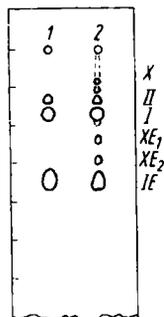
Für eine weitere Versuchsreihe wurde Serin-methylester durch Vakuumdestillation gereinigt. Nur etwa 20% destillierten bei 97°, der Rest zersetzte sich unter Bildung von Serin-anhydrid, Serin, Methanol, Ammoniak, Wasser, wenig Alanin und Spuren von Serin-peptiden.

Ein Teil des destillierten Serin-methylesters wurde i. Vak. bei 20° aufbewahrt, ein anderer 1 Stde. auf 75° erwärmt; weitere in Essigester sowie in Pyridin gelöste Proben hielten wir bei 20° oder kochten sie 10 Stdn. unter Rückfluß. Auch bei diesen Versuchen war Serin-anhydrid das Hauptprodukt. Daneben ließen sich im Papierchromatogramm Serin, Serinester und kleine Mengen von Diserin neben höheren Serin-peptiden erkennen. In einigen Fällen fanden sich spurenweise zwei Peptidester (Abbild. 5).

Der Serin-methylester reagiert etwas träger als Glycin-methylester; auch Ansätze, die einige Zeit erwärmt worden waren, enthielten noch Ausgangsmaterial. Dagegen wird Serin-methylester leichter verseift als Glycin-methylester, erkenntlich daran, daß alle Reaktionsprodukte reichlich Serin enthielten.

Beim Glycin-methylester lenken hydroxylhaltige Lösungsmittel, wie gezeigt, den Reaktionsverlauf ganz in die Richtung der Anhydridbildung. Es ist daher naheliegend, die Oxygruppe des Serins dafür verantwortlich zu machen, daß sich unter unseren Versuchsbedingungen so gut wie ausschließlich Serin-anhydrid bildet.

Die Kondensation der Aminosäure- und Peptidester ist nichts anderes als eine Aminolyse einer Estergruppe, durch die Aminogruppe des Reaktionspartners. Demnach sollten sich Faktoren, welche die Geschwindigkeit der Aminolyse bzw. Ammonolyse von Estern beeinflussen, im gleichen Sinn auch



Abbild. 5. Papierchromatogramm des kondensierten Serin-methylesters mit Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5. 1) Testgemisch aus Serin (I), Diserin (II) und Serin-methylester (IE). 2) Kondensationsprodukt. XE<sub>1</sub> und XE<sub>2</sub> sind Serinpeptidester, deren Flecke nach vorsichtigem Verseifen mit wäßrigem Bariumhydroxyd bei 20° zugunsten der Serinpeptidflecke X verschwinden.

<sup>13</sup>) A. M. Mattocks u. W. H. Hartung, J. biol. Chemistry **165**, 501 [1946], fanden Schmp. 114°.

bei den Kondensationen der Aminosäure-ester auswirken. Das ist tatsächlich der Fall. Methylester von Carbonsäuren werden leichter ammonolytisch als die Ester anderer Alkohole<sup>14)</sup> und in Analogie dazu kondensieren von allen Aminosäure-estern die Methylester am leichtesten.

Die Aminolyse eines Carbonsäure-esters durch Äthylamin verläuft (wahrscheinlich infolge sterischer Hinderung durch die C-Methyl-Gruppe) langsamer als mit Methylamin<sup>15)</sup>; ferner wird Essigsäure-methylester schneller ammonolytisch als Propionsäure-methylester.

Dementsprechend sollte beim Alanin-methylester sowohl die Aminogruppe (wegen der sterisch hindernden Methylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom, als auch die Carbomethoxygruppe (wegen der elektronen-abstoßenden Wirkung der am  $\alpha$ -C-Atom stehenden Methylgruppe) reaktionsträger sein, als die Amino- und Carbomethoxy-Gruppen des Glycin-esters. Wie oben erwähnt, trifft das in der Tat zu.

### III. Zur Reaktionsfähigkeit des Tetraglycin-methylesters

Während Diglycin-methylester leicht zum Glycin-anhydrid cyclisiert und Triglycin-methylester sich je nach den Reaktionsbedingungen schnell zum Hexaglycin-methylester oder höheren Polyglycinestern kondensiert, ist der Tetraglycin-methylester sehr wenig reaktionsfähig. Daher bleibt die unter milden Bedingungen durchgeführte lineare Kondensation des Glycin-methylesters auf der Tetrapeptidstufe stehen.

Da über die Reaktionsfähigkeit des Tetraglycin-methylesters widersprechende Literaturangaben vorlagen – nach E. Fischer bleibt er bei 110° unverändert, nach Th. Curtius aber soll er höhermolekulare Produkte bilden –, haben wir den Ester mit und ohne Lösungsmittel verschieden lange und verschieden hoch erhitzt und die Reaktionsprodukte papierchromatographisch untersucht. Die in Tafel 3 zusammengestellten Ergebnisse bestätigen die Befunde E. Fischers.

Tafel 3. Kondensationsversuche am Tetraglycin-methylester

	Zeit	Temp.	Ergebnis
in Methanol ..	4 Stdn.	64°	keine Veränderung
in Wasser ....	4 „	100°	Tetrapeptid, wenig Ester
trocken .....	14 Tage	20°	keine Veränderung
trocken .....	4 Stdn.	125°	keine Veränderung
trocken .....	4 „	140°	rund 40% Ester, 60% Tetrapeptid
trocken .....	4 „	160°	braun gefärbt, nur Tetrapeptid
trocken .....	4 „	180°	schwarz, Spuren von Glycin und Tetrapeptid
trocken .....	5 Min.	205°	schwarzbraun, keine ninhydrinpositiven Substanzen

<sup>14)</sup> M. Gordon, J. G. Miller u. A. R. Day, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1946 [1948].

<sup>15)</sup> E. Mc. C. Arnetti, J. G. Miller u. A. R. Day, J. Amer. chem. Soc. **72**, 5635 [1950].

Der Ester läßt sich in der Tat auch bei höherer Temperatur nicht zur Kondensation bringen. Bemerkenswert ist, daß er auch unter Ausschluß von Feuchtigkeit bei 140° beginnt, in das Tetrapeptid überzugehen<sup>16)</sup>. Von 180° ab zersetzt sich allmählich auch das Tetrapeptid.

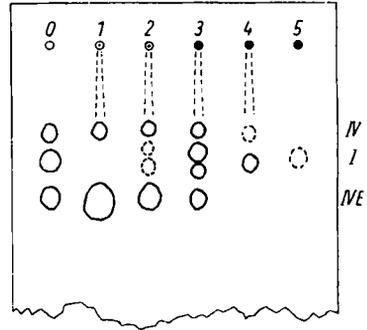
Der Tetraglycin-methylester schmilzt, schnell erhitzt, bei 205–210° unter Zersetzung. Ein Bild des Zersetzungsvorganges erhält man, wenn kleine Proben in dünnwandigen Kapillaren in den auf 210° erhitzten Schmp.-Block gebracht und nach wenigen Sekunden papierchromatographisch untersucht werden (Abbild. 6).

Der Tetraglycinester geht demnach beim Schmelzen sofort in das Peptid über, bald darauf brechen die Peptidbindungen auf und es erscheinen niedrigere und höhere Zersetzungsprodukte, die sich schnell weiter umwandeln. Die bei dieser Temperatur ablaufenden Reaktionen haben also mit einer normalen Esterkondensation nichts mehr zu tun.

Bei früheren Versuchen, Aminosäure-ester durch Erhitzen in Polypeptide überzuführen, hat man die mittlere Kettenlänge der Kondensationsprodukte aus ihren Methoxyl- oder Äthoxylwerten errechnet. Nach unseren Ergebnissen kann dieses Verfahren zu falschen Schlüssen führen. Denn bei höheren Temperaturen und sehr langen Reaktionszeiten kann infolge thermischer Esterspaltung der Methoxylgehalt auf wenige Prozente seines Anfangswertes absinken, ohne daß eine Kondensation eingetreten ist. Bedenklich ist es ferner, bei diesem Verfahren die Kondensationsprodukte, wie in der Literatur beschrieben, mit heißem Wasser auszuziehen, um die niedriger molekularen Peptide abzutrennen. Man entfernt nämlich so aus einem Gemisch von Peptiden und Peptidestern vorzugsweise die Peptidester. Infolgedessen werden die Peptide im Rückstand angereichert, und dessen Methoxylgehalt ergibt erst recht kein richtiges Maß des Kondensationsgrades.

#### Beschreibung der Versuche

Glycin-methylester wurde nach M. Frankel und E. Katchalski<sup>6)</sup>, Alanin-methylester, Dialanin, Trialanin, Diserin und sämtliche Aminosäure-anhydride nach E. Fischer<sup>7, 9, 17)</sup> dargestellt. Der Aufbau der Glycinpeptide bis zum Pentapeptid erfolgte nach E. Fischer<sup>3, 17)</sup> durch stufenweises Kuppeln mit Chloracetylchlorid. Die Ausbeute an Diglycin (20% d.Th.) war auf diesem Wege schlechter als bei der Darstellung aus Glycin-anhydrid (35% d.Th.). Di-, Tri- und Tetraglycin wurden mit HCl-Methanol in die Esterhydrochloride überführt. Diglycin- und Triglycin-methylester ließen sich aus ihren Hydrochloriden mit Ammoniak<sup>6, 18)</sup> gewinnen; Tetraglycin-methylester, bei dem



Abbild. 6. Papierchromatogramm der thermischen Zersetzungsprodukte des Tetraglycin-methylesters in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) bei 210°. 0 Testgemisch aus I, IV und IVE. 1 bis 5 nach 10, 15, 20, 30 und 45 Sek. Zersetzungszeit.

<sup>16)</sup> Über den Verbleib der Methylgruppe vergl. L. A. Ae. Sloytermann u. H. I. Veenendaal, *Reueil Trav. chim. Pays-Bas* 71, 137 [1952].

<sup>17)</sup> E. Fischer u. E. Fournau, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 34, 2868 [1901]; E. Fischer u. K. Kautzsch, ebenda 38, 2375 [1905]; E. Fischer u. K. Raske, ebenda 39, 3981 [1906]; E. Fischer, ebenda 40, 1501 [1907].

<sup>18)</sup> G. Hillmann, *Z. Naturforsch.* 1, 682 [1946].

das Ammoniak-Verfahren wegen seiner geringen Löslichkeit in Äther und Chloroform versagt, wurde nach F. Fischer<sup>2)</sup> aus seinem Esterhydrochlorid freigesetzt.

**Diglycin-methylester:** Durch eine Suspension von 2,87 g Diglycin-methylester-hydrochlorid in 50 ccm trockenem Chloroform leitete man  $\frac{1}{2}$  Stde. trockenes Ammoniak, filtrierte vom Ammoniumchlorid ab und engte das Filtrat i. Vak. bis zur Kristallisation des Esters ein, der mit Äther gewaschen wurde. Rasches Arbeiten erhöht die Ausbeute, denn der Ester kondensiert sehr schnell zum Glycinanhydrid und höhermolekularen Produkten. Aus seiner wäßr. und methanol. Lösung fällt nach wenigen Minuten in guter Ausbeute krist. Glycinanhydrid aus. Auch der reine Ester, der im frischen Zustand bei 89° sintert, geht bei 20° innerhalb weniger Tage in Kondensationsprodukte über, die ab 250° braun werden.

**Triglycin-methylester:** 2 g Triglycin-methylester-hydrochlorid wurden in 30 ccm trockenem Chloroform mit Ammoniak behandelt. Beim Einengen der vom Ammoniumchlorid befreiten Chloroformlösung schieden sich weiße Flocken ab, die abfiltriert wurden. Aus der zunächst erwärmten, dann mit Äther versetzten und auf 0° gekühlten Lösung kristallisierte Triglycin-methylester aus. Er sintert bei 106°, ohne klar zu schmelzen. Bei 20° verwittern seine Kristalle innerhalb 12 Stdn. und bestehen nach einigen Tagen hauptsächlich aus Hexaglycin-methylester.

**Modifizierte Serinsynthese nach V. du Vigneaud<sup>12)</sup>:**  $\alpha,\beta$ -Dibrom-propionsäure-äthylester, Sdp.<sub>12</sub> 92° (mit 98% d.Th. Ausbeute aus Acrylsäure-äthylester erhalten) wurde mit Natriummethylat in den  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionsäure-äthylester (Sdp.<sub>14</sub> 81–82°, 85% d.Th.) übergeführt, wobei genau so gearbeitet wurde wie bei der Darstellung des Äthoxyesters<sup>12)</sup>. Schwierigkeiten, wie sie kürzlich beschrieben wurden<sup>13)</sup>, traten dabei nicht auf. Verseifung des Esters und Aminierung der in quantitativer Ausbeute erhaltenen rohen Säure lieferte  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methoxy-propionsäure. Bei deren Überführung in Serin erhält man die beste Ausbeute, wenn man nicht mehr als 50 g einsetzt, auf 1 g der zur Aminierung verwendeten  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionsäure 4 ccm 48-proz. Bromwasserstoffsäure (*d* 1.49) verwendet und die Lösung  $2\frac{1}{2}$  bis 3 Stdn. auf 115° erwärmt. Man kann auch soviel Wasser zusetzen, daß die Reaktionsmischung bei 115° siedet. Nach Beendigung der Verseifung darf die Lösung höchstens bis zur Hälfte eingedampft werden, damit beim Abkühlen neben Ammoniumbromid kein Serinhydrobromid ausfällt. Nicht abgeschiedenes Ammoniumbromid kann bei der weiteren Reinigung des Serins leicht entfernt werden. Die Ausbeute erhöht sich, wenn das ausgefallene Ammoniumbromid mit konz. Bromwasserstoffsäure ausgewaschen wird. Sie betrug 25 g reines Serin, bezogen auf 63 g rohe  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionsäure (70% d.Th.), mit reiner, dest. Säure 73% d.Theorie.

#### Serinsynthese aus Acrylnitril

**$\alpha,\beta$ -Dibrom-propionnitril:** 54 g Acrylnitril wurden ebenso wie der Acrylester bromiert. Die etwas träger verlaufende Bromaufnahme wurde durch Erwärmen auf 50° vervollständigt. Das Nitril destillierte bei 92–93°/14 Torr; Ausb. 189 g (88.5% d.Th.).

**$\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionnitril:** 198 g  $\alpha,\beta$ -Dibrom-propionnitril wurden wie der entspr. Ester mit Natriummethylat umgesetzt. Das bei 76°/12 Torr destillierende Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese verwendet. Ausbeute quantitativ.

**$\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionsäure:** 82 g Nitril wurden unter kräftigem Rühren mit 100 ccm 20-proz. Salzsäure versetzt und  $\frac{1}{2}$  Stde. unter Rückfluß gekocht. Sehr feine Verteilung des Nitrils in der Salzsäure ist erforderlich, um die Verseifung in der angegebenen Zeit zu vollenden. Längeres Kochen vermindert die Ausbeute. Die Reaktionslösung schüttelte man zunächst mit 100 ccm, dann siebenmal mit 50 ccm Äther aus und hielt den Ätherrückstand 1 Stde. auf 100°/13 Torr, um geringe Mengen Nitril zu entfernen. Ausb. 63.5 g (69% d.Th.). Das HCl-haltige Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

<sup>13)</sup> H. Bretschneider, N. Karpitschka u. G. Piekarski, Monatsh. Chem. 84, 1084 [1953].

Serin durch Aminierung des  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionitrils: 57 g Nitril wurden wie die  $\alpha$ -Brom- $\beta$ -methoxy-propionsäure aminiert. Beim Eindampfen der Reaktionslösung hinterblieb ein dunkelbrauner Sirup, der wie oben der Ätherspaltung unterworfen wurde. Das beim Eindampfen der tiefbraunen Lösung erhaltene Serin wog nach mehrfachem Umkristallisieren mit Aktivkohle 17.3 g (48% d.Th.). Es wurde durch seinen  $R_f$ -Wert, seine Löslichkeit (4.31 g in 100 ccm Wasser bei 20°) und die Reduktion zu Alanin<sup>20)</sup> charakterisiert.

Destillation des Serin-methylesters: Der nach E. Fischer<sup>9)</sup> aus 31 g Serin-methylester-hydrochlorid dargestellte, etwas Methanol und Natriumchlorid enthaltende freie Ester wurde bei 30°/10<sup>-3</sup> Torr von Resten Methanol befreit und dann schnell erwärmt. Innerhalb 10 Min. hatte sich der Kolbeninhalt in eine hellbraune krist. Masse verwandelt und nur 4.7 g (20% d.Th.) waren gegen 97° überdestilliert. (Abfall des Vak. auf 1 Torr.) Die Kohlensäurefalle enthielt 12 g einer hellbraunen Flüssigkeit, deren Destillation Ammoniak, viel Methanol und wenig Wasser lieferte. Geringe Mengen eines braunen Rückstandes bestanden dem Papierchromatogramm nach aus Serin, Serinester, wenig Alanin und aus zwei, durch sehr schwache Flecken angedeuteten, unbekannt Substanzen.

5 g des Destillationsrückstandes (11 g) lieferten bei fraktionierter Kristallisation aus Methanol-Wasser 900 mg der Form A und 300 mg der Form B des Serin-anhydrides. Der Mutterlaugenrückstand enthielt dem Papierchromatogramm nach viel Serin und Serin-anhydrid, weniger Alanin, sehr wenig Serinpeptide und in sehr kleiner Menge zwei unbekannt, ninhydrin-positive Substanzen<sup>21)</sup>.

Hydrolyse der Peptidester: 100 mg Peptidester wurden mit 5 ccm 0.2*n* Ba(OH)<sub>2</sub> bei 20° unter Luftabschluß geschüttelt. Verschiedene Ansätze wurden nach 10, 20, 30 und 60 Min. mit 0.2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert, 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt und filtriert. Die Papierchromatogramme der Lösungen zeigten, daß nach 20 Min. langer Hydrolyse alle Esterflecken verschwunden, aber noch keine Peptide und Glycin vorhanden waren. Nach 30 Min. traten die ersten Peptidabbauprodukte auf.

Kondensationsansätze: 1–4 g der frisch bereiteten Aminosäureester wurden ohne oder mit der doppelten bis vierfachen Menge Lösungsmittel eingeschmolzen und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach den oben angegebenen Zeiten wurden die z.Tl. kristallisierten Proben zerrieben, und wenn möglich, die Niederschläge abgesaugt und mit 2–5 ccm des entsprechenden Lösungsmittels ausgewaschen. Die i.Vak. getrockneten Niederschläge sowie die Rückstände der Mutterlauge wurden getrennt analysiert.

Papierchromatographie: Es wurde absteigend gearbeitet. Temperatur 20° ± 1°. Von den zahlreichen Papiersorten erwiesen sich Wathman Nr. 1 und Schleicher & Schüll 2043a und b als die besten. Entwickelt wurde mit 0.1% butanolischer Ninhydrinlösung. Die sehr schwachen Flecke der höheren Peptide werden am besten sichtbar, wenn man bei 60° solange entwickelt, bis die Aminosäureflecken deutlich zu erkennen sind und dann den Streifen bei 20° etwa 20 Stdn. im Dunkeln aufbewahrt. Die anfangs gelben Glycinpeptid-Flecken werden erst allmählich violett. Beschleunigt man diesen Vorgang durch Erhitzen, so verblässen die Aminosäureflecken bereits und die Peptidflecken werden auch schwächer.

Die Substanzen wurden stets in wäßr. Lösung (Menge 0.1 Mol.-Gew. in  $\gamma$ ) mit einer Kapillare aufgetragen. Ein cmm Lösung bildet, wie durch mehrfaches Auswiegen einer Kapillare festgestellt wurde, auf dem Papier S & S 2043b einen Flecken von 4 mm Durchmesser.

#### Lösungsmittel

1. Methanol mit steigendem Wassergehalt: keine brauchbare Trennung.
2. Äthanol mit steigendem Wassergehalt: wie 1.

<sup>20)</sup> E. Fischer u. H. Leuchs, Ber. dtsh. chem. Ges. **35**, 3787 [1902].

<sup>21)</sup> Bereits E. Abderhalden u. F. Broich, Biochem. Z. **262**, 321 [1933], haben diesen Destillationsrückstand untersucht, konnten aber nur die Form A des Serinanhydrids darin feststellen.

3. Isopropanol mit steigendem Wassergehalt: bei 5–30% Wasser gute Trennung von I<sup>22</sup>), IVE und den Peptiden II–VI, diese untereinander aber nicht.
4. Butanol, wassergesätt. I von den Peptiden gut getrennt, sonst wie 1, da allgemein zu kleine  $R_F$ -Werte.
5. *tert.*-Butanol mit steig. Wassergehalt: bei 20% Wasser wie 3.
6. Isoamylalkohol, wassergesätt. wie 4.
7. Benzylalkohol, wassergesätt. I u. II von den anderen, aber sehr kleine  $R_F$ -Werte.
8. Essigester, Butylacetat, wassergesätt., Aceton, Glykol-monomethyläther und Pyridin mit steig. Wassergehalt: wie 1.
9. Phenol, wassergesätt.: I nicht von II, von III unvollständig, III–VI gut getrennt. Peptidester nicht getrennt bei sehr hohen  $R_F$ -Werten.
10. *o*-Kresol, wassergesätt.: nach 336 Stdn. vollständige Trennung von I–V, Ester wie 9.
11. Isopropanol-Eisessig-Wasser 44:1:5: schlechter als ohne Eisessig.
12. Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 I u. II nicht, III–VI und IVE–VIE gut getrennt.
13. *tert.*-Butanol-Eisessig-Wasser 20:1:5 ähnlich wie ohne Eisessig. I u. II rücken näher, II–V auseinander, schlechter als 5.
14. Isoamylalkohol-Eisessig-Wasser 4:1:5: etwas schlechter als 12 und kleinere  $R_F$ -Werte.
15. Butanol gesätt. mit 1.5% Ammoniak: wie 4, nur stärker verwaschen.
16. Isoamylalkohol gesätt. mit 0.5% Ammoniak: wie 6, nur stärker verwaschen.
17. Phenol gesätt. mit wäßr. Ammoniak steigender Konzentration: I u. II rücken auseinander, IV u. V zusammen, bei 0.05–1% gute Trennung von I–V. Peptidester wie bei 9.
18. Pyridin-Isoamylalkohol-Wasser 7:7:6: wie 1.

Die freien Glycin-, Di- und Triglycin-methylester geben nur sehr verwaschene und ausgezogene Flecken, da sie während der Chromatographie kondensieren. Etwas deutlichere Flecken erhält man, wenn die Hydrochloride aufgetragen werden. Die Hydrochloride aller Peptide und Peptidester von Glycin haben allgemein fast die gleichen  $R_F$ -Werte wie die freien Verbindungen. Die Flecken der Glycinpeptide werden mit Ninhydrin schneller gelb und dann violett als die Flecken ihrer Ester. Es ist aber nicht immer möglich, die Peptide dadurch von den Peptidestern zu unterscheiden.

Die Peptidester haben allgemein größere  $R_F$ -Werte als die Glycinpeptide. Mit steigender C-Atomzahl der als mobile Phase dienenden Alkohole werden die  $R_F$ -Werte aller Substanzen kleiner, beim Isopropanol und *tert.*-Butanol sind die Differenzen der  $R_F$ -Werte von Glycin und Diglycin besonders groß. Durch Zusatz von Eisessig wird der Abstand dieser beiden Substanzen in allen Alkoholen geringer. Ein Zusatz von Ammoniak verändert die  $R_F$ -Werte nicht wesentlich, macht die Flecken aber unschärfer.

Die Laufzeiten gehen bei den mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln mit steigendem Wassergehalt durch ein Maximum (vergl. hierzu l. c.<sup>23</sup>).

Entwickeln der Aminosäure-anhydride mit der Pikrinsäurereaktion. Reagens: 1 Tl. gesätt. wäßr. Pikrinsäure werden mit etwa 15 Tln. einer wäßr. Lösung von Natriumcarbonat (1 Tl. gesätt. + 2 Tle. Wasser) verdünnt. Das Chromatogramm wird so stark besprüht, daß die Rückseite gerade gelb erscheint und dann bei 115–120° getrocknet. Nach 7–10 Min. erscheinen orange bis rotbraune Flecken auf gelbem Grund, die bald unendlich werden. Empfindlichkeit 10–15  $\gamma$ . Die beiden Formen des Serin-anhydrids lassen sich auch an der Farbe der Fluoreszenz im UV-Licht unterscheiden. Die Fluoreszenz wird noch deutlicher, wenn man beim Entwickeln die Pikrinsäure fortläßt und nur mit Natriumcarbonat-Lösung besprüht; Empfindlichkeit 1–2  $\gamma$ . Glycin-anhydrid gibt in keinem Falle eine Fluoreszenz. Die Methoden mit Chlor und Benzidin<sup>24</sup>) oder Chlor und Stärkelösung<sup>25</sup>) geben etwas kontrastreichere Flecken, bieten aber kaum Vorteile.

<sup>22</sup>) Die Erläuterungen der Abkürzungen siehe unter den Abbild. 1, 2 u. 3.

<sup>23</sup>) L. B. Rockland, J. L. Blatt u. M. S. Dunn, *Analytic. Chem.* **23**, 1142 [1951].

<sup>24</sup>) F. Rendel u. W. Hoppe, *Naturwissenschaften* **40**, 221 [1953].

<sup>25</sup>) H. N. Rydon u. P. W. G. Smith, *Nature* [London] **169**, 922 [1952].