

18. Wolfgang Graßmann, Helmut Hörmann und Horst Endres: Untersuchungen über die Anwendbarkeit der Reduktionsmethode zur Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren in Peptiden und Proteinen

[Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Regensburg]

(Eingegangen am 8. November 1954)

Die in zwei vorhergehenden Mitteilungen beschriebene Methode der Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren in Peptiden und Proteinen als DNP-Aminoalkohole wurde an zahlreichen synthetischen Peptiden und an Insulin auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Die erzielten Ausbeuten lagen im allgemeinen um etwa 90 %, reduktive Spaltungen von Peptidbindungen wurden in keinem Falle beobachtet. Eine Anzahl von DNP-Aminoalkoholen wurde dargestellt und deren chromatographische Trennung ausgearbeitet.

Für die Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren in Peptiden und Proteinen haben erstmals Cl. Fromageot und Mitarbb.¹⁾ vorgeschlagen, dieselben durch Reduktion ihrer freien Carboxylgruppen mit LiAlH_4 zu markieren und nach Hydrolyse des reduzierten Peptides als Aminoalkohole zu identifizieren. Gewisse Unsicherheiten der Methode, die vor allem im teilweisen Angriff von Peptidbindungen durch das Reduktionsmittel (vergl. ²⁾) und in der unbefriedigenden Abtrennung und Identifizierung der Aminoalkohole zu suchen waren, haben wir überwunden³⁾, indem wir zur Reduktion das bereits von A. C. Chibnall und M. W. Rees⁴⁾ benutzte LiBH_4 auf veresterte Peptide einwirken ließen und nach Hydrolyse das aus Aminoalkoholen und Aminosäuren bestehende Gemisch mittels Dinitrofluorbenzols (DNFB) in gelbe Dinitrophenyl(DNP)-Derivate überführten, worauf sich die DNP-Aminoalkohole auf Grund ihrer Ätherlöslichkeit und des Fehlens saurer Eigenschaften aus hydrogencarbonatalkalischer Lösung leicht von den DNP-Aminosäuren abtrennen ließen. Denselben Weg der Abtrennung und Identifizierung haben inzwischen M. Jutisz und Mitarbb.⁵⁾ beschrrieben, allerdings nach vorheriger Reduktion mit LiAlH_4 , so daß sie die ursprünglichen Endgruppen in schlechterer Ausbeute und verunreinigt durch Reduktionsprodukte nicht endständiger Aminosäuren als DNP-Aminoalkohole erhielten. Auch H. Jatzkewitz und Nguyen-Dang Tam⁶⁾ haben die Aminoalkohole in DNP-Derivate übergeführt, wobei es ihnen jedoch nicht gelang, sie i. Hochvak. vollkommen frei von DNFB zu erhalten. Wir haben diese Verunreinigungen durch Umsetzung mit einer nachträglich zugesetzten Aminosäure entfernt, deren DNP-Derivat sich in alkalischer Lösung leicht von den ätherlöslichen DNP-Aminoalkoholen abtrennen läßt.

¹⁾ Cl. Fromageot, M. Jutisz, D. Meyer u. L. Penasse, *Biochim. biophysica Acta* **6**, 283 [1950].

²⁾ Vergl. R. Nystrom u. W. G. Brown, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3738 [1948]; A. Uffer u. E. Schlittler, *Helv. chim. Acta* **31**, 1397 [1948]; P. Karrer u. B. J. R. Nicolaus, ebenda **35**, 1581 [1952]; V. M. Mićović u. M. L. Mihailović, *J. org. Chemistry* **18**, 1190 [1953]; M. Jutisz, D. M. Meyer u. L. Penasse, *Bull. Soc. chim. France* **1954**, 1087.

³⁾ W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, *Chem. Ber.* **86**, 1477 [1953].

⁴⁾ *Biochem. J.* **48**, xlvii [1951].

⁵⁾ M. Jutisz, M. Privat de Garilhe, M. Suquet u. C. Fromageot, *Bull. Soc. Chim. biol.* **36**, 117 [1954]; vergl. auch M. B. Williamson u. J. M. Passmann, *Biochim. biophysica Acta* **15**, 246 [1954].

⁶⁾ H. Jatzkewitz u. Nguyen-Dang Tam, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **296**, 188 [1954].

In einer Untersuchung über die Endgruppen des Prokollagens⁷⁾ haben wir inzwischen gefunden, daß mit dieser Methode einzelne Aminosäuren des Prokollagens (Glykokoll, Valin) zum Aminoalkohol reduziert werden, während sie sich mittels der Thiohydantoinmethode von P. Schlack und W. Kumpf⁸⁾ nicht als carboxylendständig nachweisen lassen. Auffälligerweise wurde in diesem Falle die gleiche Menge an Aminoalkoholen auch ohne vorhergehende Veresterung des Proteins erhalten. Nachdem Lithiumborhydrid, soweit bekannt, nur veresterte, nicht aber freie Carboxyle reduzierte, lag der Schluß nahe, daß die zur Reduktion gelangten Carboxyle schon im Prokollagen selbst esterartig gebunden vorliegen, und zwar wahrscheinlich an Kohlenhydratgruppierungen, die dieses Protein in beträchtlicher Menge enthält.

Da über die beschriebene Methode nur ein verhältnismäßig geringes Erfahrungsmaterial vorliegt, schien es, auch im Hinblick auf die genannten Befunde, notwendig, weitere Versuche an Material von bekannter Konstitution durchzuführen.

Unsere in Tafel 1 kurz zusammengefaßten Ergebnisse zeigen zunächst, daß nach Veresterung und Acetylierung mit Methanol-Acetanhydrid (vergl.³⁾) die carboxylendständige Aminosäure vollständig reduziert wird und in einer Ausbeute von meist etwa 90% als DNP-Aminoalkohol aus der Ätherphase isoliert werden kann; in keinem Falle finden sich Anteile der endständigen Aminosäure in nicht reduzierter Form in der wäßrigen Phase. Die Reaktion erlaubt also eindeutige quantitative Aussagen.

Dies ist ein sehr beachtlicher Vorteil gegenüber der Thiohydantoinmethode von Schlack und Kumpf⁸⁾ und der Methode mit Hydrazin⁹⁾, aber auch beispielsweise gegenüber der Bestimmung der Amino-Endgruppen nach Sanger¹⁰⁾, bei der ein wechselnder, stets aber ein sehr beachtlicher Teil der DNP-Aminosäuren bei der Hydrolyse aufgespalten und der Erfassung entzogen wird.

In keinem Falle haben wir, anders als bei der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid^{1, 5)}, nicht endständige Aminosäuren als Aminoalkohole erhalten.

Nicht veresterte Aminosäuren und Peptide, deren Verhalten im Hinblick auf unsere Befunde an Prokollagen eine gründlichere Prüfung erforderte, erwiesen sich als nicht vollkommen unangreifbar. Die Ausbeute an DNP-Aminoalkohol überschreitet aber bei Aminosäuren 1% nicht, bei den geprüften Di- und Tripeptiden liegt sie um einige Prozente höher, wobei Peptide mit carboxylendständigem Phenylalanin, die Ausbeuten von 8 bzw. 11% an Aminoalkohol lieferten, eine Sonderstellung einzunehmen scheinen. Nochmals höher, nämlich bei etwa $\frac{1}{5}$ des nach Veresterung gefundenen Wertes, liegt die Ausbeute bei nicht verestertem Insulin^{11, 12)}.

7) W. Graßmann, H. Endres u. A. Steber, Z. Naturforsch. **9b**, 513 [1954].

8) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **154**, 125 [1926].

9) S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chim. Soc. Japan **25**, 214 [1952].

10) F. Sanger, Biochem. J. **39**, 507 [1945].

11) Die Arbeiten an Insulin wurden unter der Mitarbeit von R. Strobel ausgeführt.

12) Den Farbwerken Hoechst sind wir für die Überlassung einer Probe hochgereinigten Insulins sehr zu Dank verpflichtet.

Tafel 1. Ausbeuten an DNP-Aminoalkoholen von veresterten und freien Aminosäuren und Peptiden

Aminosäure bzw. Peptid	Ausbeute an DNP- Aminoalkohol in % d. Th.		Begleitstof- fe des DNP- Aminoalko- hols in der Ätherphase	DNP-Aminosäuren in der äßr. Phase*)	
	nach Ver- esterung	ohne Ver- esterung		nach Ver- esterung	ohne Ver- esterung
Alanin	94.8**)	1	—	—	Ala
Valin	88.0**)	1	—	—	Val
Phenylalanin	92.9**)	1	—	—	Phe
Glutaminsäure	83.2***)	1	—	—	Glu
Serin	80.0***)	1	—	—	Ser
Lysin	51.4§)	1	—	—	Lys
Gly-gly ^{§)}	87.0	2	—	Gly	Gly
Gly-phe ^{§)}	89.0	8.3	—	Gly	Gly, Phe
Gly-asp	50.0§§)	1.76§§)	—	Gly	Gly, Asp
Gly-phe-gly	90.4	4.24	—	Gly, Phe	Gly, Phe, Glu
Gly-leu-gly	87.2	3.84	DNP-Leu	Gly, Leu	Gly, Leu, Glu
Val-gly-lys	88.3	3.11	—	Gly, Val	Gly, Val, Lys
Pro-gly-phe	91.6	11.5	—	Gly, Pro	Gly, Pro, Phe
Leu-gly-gly	90.0	6	DNP-Leu	Gly, Leu	Gly, Leu
Insulin	2.39 ^{!)}	0.482 ^{!)}	DNP-Leu DNP-OH	Sämtliche im Insulin vor- kommenden Aminosäuren	

* Die zur Entfernung von überschüssigem DNFB zugesetzte Aminosäure ist weggelassen.

** Präparativ bestimmte Ausbeuten.

*** Präparative Ausbeuten aus *N*-Acylestern (vergl. S. 106 und 107).

§) Bezüglich der schlechteren Ausbeute vergl. S. 107.

§§) Zur Natur des erhaltenen Reduktionsproduktes vergl. S. 108.

!) Mol DNP-Alaninöl pro 100 Mol Aminosäure. Bezüglich endständigem Asparagin vergl. S. 105.

In keinem Falle indessen wird Gleichheit der Ausbeute mit und ohne Veresterung gefunden, wie wir dies im Falle des Prokollagens und des Kollagens¹³⁾ festgestellt haben.

Nach den Arbeiten Sangers¹⁴⁾ besteht das Molekül des Insulins mit einem Mol.-Gew. von 12000 aus vier durch Schwefelbrücken verbundenen Peptidketten, von denen jeweils zwei gleichartig sein sollen. In einer neueren Publikation¹⁵⁾ hat Sanger diese Hypothese auf Grund von Molekulargewichtsbestimmungen verschiedener Autoren¹⁶⁾, welche für das Monomere einen Wert von 6000 fanden, dahin abgeändert, daß das Monomere nur mehr aus zwei Ketten besteht. An ihren Carboxylenden sitzen Alanin und Asparagin, wie auch zahlreiche andere Autoren mit verschiedenen Methoden festgestellt haben¹⁷⁾. Nach Reduktion von Insulin, das zuerst mit Methanol-Acetanhydrid acety-

¹³⁾ W. Graßmann und Mitarbb., unveröffentlicht.

¹⁴⁾ F. Sanger, *l.c.*¹⁰⁾; *Biochem. J.* **44**, 126 [1949]; **45**, 563 [1949]; F. Sanger u. H. Tuppy, *Biochem. J.* **49**, 463, 481 [1951]; F. Sanger u. E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* **53**, 353, 366 [1953].

¹⁵⁾ F. Sanger, L. F. Smith u. R. Kitai, *Biochem. J.* **53**, vi [1954].

¹⁶⁾ E. Fredericq u. H. Neurath, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2684 [1950]; J. Harfenist u. L. C. Craig, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 3087 [1952]; D. W. Kupke u. K. Lindenström-Lang, *Biochim. biophysica Acta* **13**, 153 [1954].

¹⁷⁾ J. I. Harris, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2944 [1952]; R. A. Turner u. G. Schmerzler, *Biochim. biophysica Acta* **11**, 586 [1953], **13**, 553 [1954]; vergl. auch J. Lens, ebenda **3**, 367 [1949]; A. C. Chibnall u. M. W. Rees, *Biochem. J.* **48**, xlvi [1951], **52**, iii [1952]; S. G. Waley u. J. Watson, *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 2394; V. H. Baptist u. H. B. Bull, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 1727 [1953]; P. Jollès u. Cl. Fromageot, *Biochim. biophysica Acta* **9**, 416 [1952].

lierend verestert worden war, konnten wir erwartungsgemäß nur Alaninol als DNP-Derivat in einer Ausbeute entsprechend 2.4 Mol% isolieren. Aus der Formel von Sanger würde sich eine Menge von 1.96 Mol% errechnen. Endständiges Asparagin konnte nicht erfaßt werden, da die β -Carbonsäureamidgruppierung durch Lithiumborhydrid nicht reduziert wird. Infolgedessen enthält die aus dem ursprünglichen Asparaginrest nach Hydrolyse des reduzierten Eiweißkörpers gebildete Verbindung noch eine ionisierbare Carboxygruppe, so daß sie nicht durch Überführung in das DNP-Derivat und anschließende Ätherextraktion der alkalischen Lösung von den gleichfalls mitgebildeten DNP-Aminosäuren abgetrennt werden kann. Den Befund von Fromageot und Mitarbb.^{1,18}), wonach bei Reduktion von Insulin mit Lithiumaluminiumhydrid und anschließender Hydrolyse Colamin auftritt, das zweifellos aus der Mitte der Peptidkette stammt, können wir bei Verwendung von Lithiumborhydrid als Reduktionsmittel nicht bestätigen. Im Ätherextrakt findet sich neben DNP-Alaninol lediglich etwas DNP-Leucin und Dinitrophenol.

Wie man aus Tafel 1 entnehmen kann (vergl. auch ⁷)), werden die DNP-Aminoalkohole in einigen Fällen von anderen DNP-Verbindungen begleitet, die keine DNP-Aminoalkohole sind, aber keine Unsicherheiten der Methode mit sich bringen. Bei leucinhaltigen Peptiden wird immer etwas DNP-Leucin, auch aus stark alkalischer Lösung, von der Ätherphase aufgenommen, wie wir bei Ausschüttelungsversuchen der wäßrigen Lösung eines Gemisches verschiedener DNP-Aminosäuren bei verschiedenem p_{H} feststellen konnten. (Einzelheiten siehe im Versuchsteil.)

In einigen Fällen, besonders bei Verwendung eines größeren Überschusses von DNF_B, war der isolierte DNP-Aminoalkohol auch von 2.4-Dinitrophenol begleitet. Diese Verbindung, die an und für sich aus hydrogencarbonatalkalischer Lösung nicht durch Äther ausgeschüttelt werden kann, wird, wie wir feststellten, bei Gegenwart von Borsäure, die vom LiBH_4 stammt, von der Ätherphase aufgenommen.

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung eines Gemisches von DNP-Aminoalkoholen¹⁹) wandert DNP-Leucin mit DNP-Leucinol und Dinitrophenol mit DNP-Valinol. Eine Auftrennung dieser Substanzpaare gelingt vorteilhaft auf papierelektrophoretischem Wege²⁰) unter Verwendung alkalischer Puffer ($m/21$ Veronalpuffer p_{H} 8.6), wobei DNP-Leucin bzw. Dinitrophenol anodisch wandern, während die ungeladenen DNP-Aminoalkohole keine Ablenkung erfahren. Auf säulenchromatographischem Wege gelingt eine quantitative Trennung mit Essigester an alkalisch gepufferten Kieselgurssäulen, welche die ionisierbaren Begleitsubstanzen zurückhalten, während die neutralen DNP-Aminoalkohole ungehindert durch die Säule laufen. Auf Papierchromatogrammen ist Dinitrophenol leicht durch Betupfen mit verdünnter Säure erkennbar, wobei der Fleck entfärbt wird.

Ergänzende Angaben zur Darstellung der DNP-Aminoalkohole

Im Zusammenhang mit der Untersuchung über die Anwendungsbreite der beschriebenen Methode haben wir zu den bereits von uns beschriebenen DNP-Aminoalkoholen eine weitere Anzahl hergestellt. Einige davon waren bereits aus tabellarischen Zusammenstellungen der eingangs erwähnten Arbeiten^{5, 6})

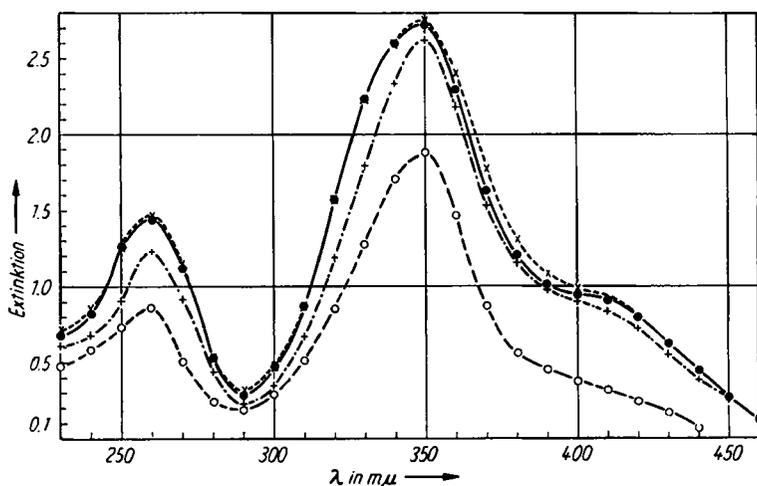
¹⁸) Vergl. auch M. Jutisz, Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 109 [1954].

¹⁹) W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **296**, 208 [1954].

²⁰) W. Graßmann u. K. Hannig, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 1 [1952]; **292**, 32 [1953].

bekannt, wobei nur summarisch erwähnt wurde, daß die entsprechenden Aminosäuren^{21, 22)} oder ihre Ester²³⁻²⁶⁾ mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und anschließend in bekannter Weise mit DNFB umgesetzt wurden. Bei einigen Vertretern sind jedoch Schwierigkeiten aufgetaucht, die zum Teil bereits in der Literatur bekannt waren, was uns in einigen Fällen zwang, abgeänderte Darstellungswege einzuschlagen. Außerdem mußte untersucht werden, ob das zum Vergleich hergestellte Produkt mit dem bei der Endgruppenbestimmung an Peptiden erhaltenen immer identisch war.

DNP-Glutamin-diol: Bei der Darstellung von Glutamin-diol durch LiAlH_4 -Reduktion von Glutaminsäure-diäthylester entsteht infolge eines Ringschlusses dieser Verbindung zu Pyrrolidoncarbonsäureester in beträchtlichem Maße Prolinol als Nebenprodukt²⁴⁾. Diese Cyclisierung kann durch Acylieren der Aminogruppe vollständig verhindert werden, so daß bei Peptiden mit endständiger Glutaminsäure kein Prolinol als Nebenprodukt gefunden wird. Als Modells substanz verwendeten wir *N*-Benzoyl-glutaminsäure-dimethylester und erhielten nach Reduktion mit LiBH_4 Glutamin-diol als kristallisiertes DNP-Derivat in 83.2-proz. Ausbeute. Der Schmelzpunkt liegt im Gegensatz zu den Angaben von Jutisz⁵⁾, dessen Produkt nur teilweise kristallisiert war, bei 103°, das Absorptionsspektrum²⁷⁾ in Essigester entspricht dem anderer DNP-Aminoalkohole (Abbild. 1). Eine Mikroendgruppenbestimmung von Glycyl-phenylalanyl-glutaminsäure und Glycyl-leucyl-glutaminsäure er-



Abbild. 1. Absorptionsspektren von --o-- DNP-Glutamin-diol, —•— DNP-Serinol, --x-- DNP-2-Amino-butanol-(1) und --+-- DNP-Alanin in Essigester (0.16 $\mu\text{Mol/ccm}$)

²¹⁾ O. Vogl u. M. Pöhm, *Mh. Chem.* **83**, 541 [1952].

²²⁾ O. Vogl u. M. Pöhm, *Mh. Chem.* **84**, 1097 [1953].

²³⁾ P. Karrer, P. Portmann u. M. Suter, *Helv. chim. Acta* **31**, 1617 [1948].

²⁴⁾ P. Karrer u. P. Portmann, *Helv. chim. Acta* **31**, 2088 [1948].

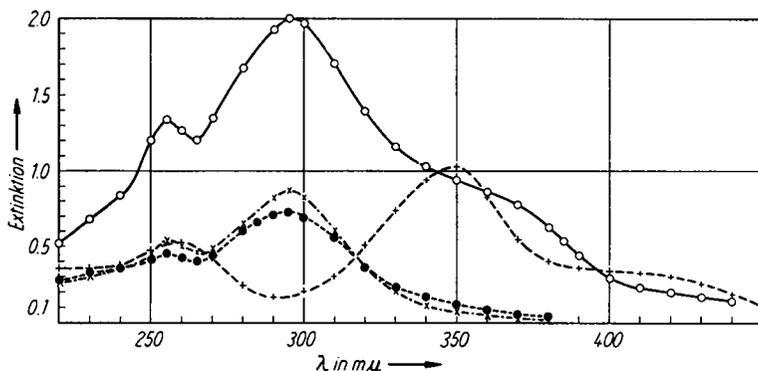
²⁵⁾ P. Karrer u. P. Portmann, *Helv. chim. Acta* **32**, 1034 [1949].

²⁶⁾ P. Karrer, P. Portmann u. M. Suter, *Helv. chim. Acta* **32**, 1156 [1949].

²⁷⁾ Sämtliche Extinktionsmessungen wurden mit dem Spektralphotometer mit Monochromator M4 Q der Firma Carl Zeiß ausgeführt.

gab ebenfalls nur DNP-Glutamin-diol in der erwarteten Menge, in letzterem Falle allerdings verunreinigt durch DNP-Leucin, ein Umstand, auf den oben hingewiesen worden ist.

α, ϵ -Di-DNP-Lysinol: Mit Ausnahme einer Notiz von Cl. Fromageot und Mitarbb.¹⁾, die keine experimentellen Angaben enthält, ist noch keine Darstellungsweise für Lysinol bekannt. Die Schwierigkeit liegt in der Schwerlöslichkeit von Lysinstern in den für die Reduktion mit LiAlH_4 oder LiBH_4 gebräuchlichen Lösungsmitteln. Wir haben nach mehrstündigem Kochen in ätherischer Suspension mit LiAlH_4 Lysinol erhalten und in 58-proz. Ausbeute als α, ϵ -Di-DNP-Derivat isoliert. Dasselbe Produkt erhält man auch bei der Bestimmung von endständigem Lysin in Valyl-glycyl-lysin nach acetylierender Veresterung (vergl.³⁾), infolge der besseren Löslichkeit des *N*-Acetyl-peptidesters jedoch in nahezu quantitativer Ausbeute. Die Verbindung zeigt, wohl infolge der Anwesenheit von zwei DNP-Resten im Molekül, eine wesentlich höhere Extinktion als die anderen DNP-Aminoalkohole, wobei sich den für Mono-DNP-Aminoalkoholen charakteristischen Maxima eine wesentlich intensivere Bande mit einem Maximum von 290 $m\mu$ überlagert (Abbild. 2).



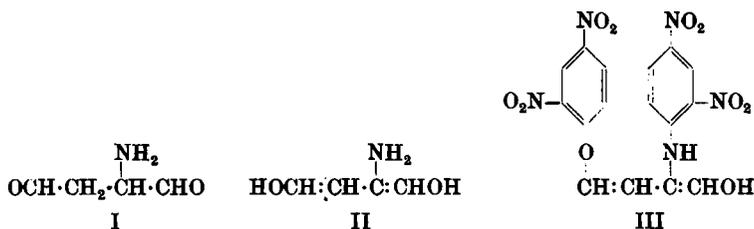
Abbild. 2. Absorptionsspektren von —○— α, ϵ -Di-DNP-Lysinol, —·—·— Di-DNP-Enol-asparagindial, —●—·— *N,O*-Di-DNP-Tyrosinol und —+—+— DNP-Colamin in Essigester (0.066 μ Mol/ccm)

DNP-Serinol: Bei der Reduktion von Serin-methylester mit LiAlH_4 nach P. Karrer und Mitarbb.²³⁾ bilden sich neben Serinol noch andere nicht identifizierte Verbindungen, so daß das Reduktionsprodukt uneinheitlich ist. Wir haben daher untersucht, ob *N*-Acyl-serinester bei Reduktion mit LiBH_4 — also Bedingungen, wie sie bei der Endgruppenbestimmung nach unserer Methode vorliegen — nach Verseifung einheitliche, zur Identifizierung von Serin brauchbare Reduktionsprodukte liefern. Als Modells substanz, deren Bindungsverhältnis demjenigen von Peptiden mit endständigem Serin entspricht, haben wir *N*-Benzoyl-serinester der angegebenen Reaktionsfolge unterworfen und konnten dabei in nahezu quantitativer Ausbeute Serinol in Form der DNP-Verbindung isolieren. Ihr Schmelzpunkt stimmt mit dem von Jutisz⁵⁾ und Jatzkewitz⁶⁾ angegebenen überein. Das Absorptionsspektrum zeigt den für DNP-Aminoalkohole üblichen Verlauf (Abbild. 1).

DNP-2-Amino-butanol-(1) aus Methionin: Bei der Behandlung von *N*-Acetyl-methionin-methylester mit Lithiumborhydrid wird nach unseren Befunden die Methylmercaptogruppe abhydriert, so daß man 2-Amino-butanol-(1) erhält. Das entstandene Methylmercaptan entweicht beim Zersetzen der entstandenen Borkomplexe. 2-Amino-butanol wurde als DNP-Derivat gewonnen; es war identisch mit einem aus α -Amino-buttersäure dargestelltem Präparat. Das Absorptionsspektrum ist von dem anderer Mono-DNP-Aminoalkohole nicht wesentlich verschieden (Abbild. 1). Unser Ergebnis steht im Gegensatz zu einer Arbeit von Vogl und Pöhm²⁸⁾, die eine Bildung von Methioninol bei der Reduktion von Methionin mit Lithiumaluminiumhydrid beschreiben.

N-DNP, β -*O*-DNP-Dienol-aminosuccin-dialdehyd (III) aus Asparaginsäure: Reduziert man Asparaginsäure-dimethylester mit Lithiumaluminiumhydrid und setzt das erhaltene Produkt in üblicher Weise mit DNFB um, so erhält man eine Verbindung, deren Analysenwerte mit den für DNP-Asparagin-diol berechneten nicht in Einklang zu bringen sind²⁸⁾.

Das Absorptionsspektrum in Essigester zeigt nicht die bei anderen Mono-DNP-Aminoalkoholen üblichen Maxima von 260 und 350 μ , vielmehr findet man ein einziges bei 290 μ , mit einer Schulter bei 260 μ (Abbild. 2). Ein ähnliches Ergebnis haben wir an α, ϵ -Di-DNP-Lysinol und an *N, O*-Di-DNP-Tyrosinol beobachtet, und es scheint für die Anwesenheit zweier DNP-Reste im Molekül charakteristisch zu sein. Titriert man die Nitrogruppen mit TiCl_3 ²⁹⁾, so errechnet sich ein Gehalt von 4 Nitrogruppen auf 5 Stickstoffatome, womit die Anwesenheit von zwei Dinitrophenylresten im Molekül gesichert



ist. Außerdem gibt die Verbindung eine deutliche, wenn auch nicht sehr intensive rote Eisenchlorid-Reaktion und zahlreiche Aldehydreaktionen; so reduziert sie ammoniakalkalische Silbernitratlösung, färbt essigsäure Benzidinlösung rot und scheidet Quecksilber aus Nesslerischem Reagens ab³⁰⁾. Auch alkalische Permanganatlösung wird sofort entfärbt. Alle diese Befunde deuten auf eine enolisierbare Aldehydgruppe. Das läßt sich nur so verstehen, daß die beiden Carbäthoxygruppen des Asparaginsäure-diester nur bis zur Aldehydstufe reduziert wurden. Der entstandene Aminosuccindialdehyd (I) reagiert in seiner durch Konjugation stabilisierten Enolform (II) mit DNFB unter

²⁸⁾ Siehe l. c.¹⁰⁾, vergl. dagegen l. c.²⁸⁾.

²⁹⁾ S. Maruyama, Sci. Pap. Inst. physic. chem. Res. [Tokyo] 16, 196 [1931]; s. a. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 2, S. 627.

³⁰⁾ E. Feder, Arch. Pharmaz. Ber. deutsch. pharmaz. Ges. 245, 25 [1907].

Substitution der Amino- und der β -ständigen Enolgruppierung, in Analogie zur Reaktion von phenolischen Oxygruppen mit DNFB (vergl.¹⁰), während das α -ständige enolische Hydroxyl infolge der Nähe des Dinitrophenylamino- restes frei bleibt. Die sich daraus ergebende Strukturformel III ist mit den Analysendaten bei Annahme von 2 Moll. Kristallalkohol vereinbar, dessen Anwesenheit allerdings bei der Mol.-Gew.-Bestimmung viel zu niedrige Werte (220 gegenüber 525.42) verursacht. Im folgenden wird die Verbindung aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Di-DNP-Enol-asparagin-dial bezeichnet. Sie entsteht auch bei Reduktion mit Lithiumborhydrid, saurer Verseifung und anschließender Umsetzung mit DNFB aus *N*-Acetyl-asparaginsäure-dimethyl- ester und aus Glycyl-L-asparaginsäure nach acetylierender Veresterung (vergl.³).

Ein ähnlicher Fall einer nur teilweisen Reduktion von Carboxyl- bzw. Carbäthoxy- gruppen wurde bereits von F. Weygand und Mitarbb.³¹) beschrieben, die Oxalsäure und ihre Ester mit Lithiumaluminiumhydrid nur bis zum Glyoxal reduzieren konnten. Eine Disproportionierung des Aminosuccinaldehyds zu Aminobutyrolacton bzw. α -Amino- γ -oxy-buttersäure, die nicht mehr ausgeäthert werden kann, oder ein Ringschluß zu Pyrazin- derivaten – beides Reaktionen, die man erwarten könnte – scheint nach obigen Befunden nicht in bedeutendem Maße zu erfolgen. Immerhin könnten die schlechteren Aus- beuten an Di-DNP-Enol-asparagin-dial (89%) gegenüber denen der DNP-Aminoalkohole damit erklärt werden.

Zur chromatographischen Trennung der DNP-Aminoalkohole

Die säulenchromatographische Trennung der in dieser Arbeit neu darge- stellten DNP-Aminoalkohole sowie von *N,O*-Di-DNP-Tyrosinol (Darst. vergl.⁶) gelingt nach der von uns bereits beschriebenen Methode¹⁹). Wir verwendeten als Säulenfüllung ein Gemisch von Kieselsäure-Celite (4 : 1) und entwickelten die DNP-Aminoalkohole mit verschiedenen Lösungsmitteln, bestehend aus Ligroin, Eisessig, Aceton und Essigester, ein System, das erstmals von F. C. Green und L. M. Kay³²) zur Trennung von DNP-Aminosäuren vorgeschlagen worden ist.

Ein anderes verteilungschromatographisches System, das mit vertauschten Phasen arbeitet, haben Jutisz und Mitarbb.⁵) angegeben. Dabei werden die DNP-Aminoalkohole an silikonbehandelter Kieselgur mit wäBr. Lösungsmitteln, enthaltend Essigsäure und Butylacetat, getrennt.

Die Messung der einzelnen Fraktionen geschah im Kolorimeter „Eppen- dorf“ bei 366 μ . Abbild. 3 zeigt die bei dieser Wellenlänge gefundenen linearen Eichkurven für eine Anzahl von DNP-Aminoalkoholen. Im Falle von α,ϵ - Di-DNP-Lysinol, *N,O*-Di-DNP-Tyrosinol und Di-DNP-Enol-asparagin-dial³³) wurde bei 366 μ in einem vom Absorptionsmaximum weiter entfernten Be- reich gemessen, wodurch sich ziemlich niedrige Extinktionen ergaben. Für künftige Bestimmungen erscheint es daher richtiger, die Messungen dieser

³¹) F. Weygand, G. Eberhardt, H. Linden, F. Schäfer u. I. Eigen, *Angew. Chem.* **65**, 525 [1953].

³²) *Analytic. Chem.* **24**, 726 [1952].

³³) In unserer vorhergehenden Mitteilung¹⁹) hatten wir für Di-DNP-Enol-asparagin-dial einen anderen Extinktionswert angegeben, da wir der Berechnung eine jetzt überholte Molekülformel zugrunde gelegt hatten.

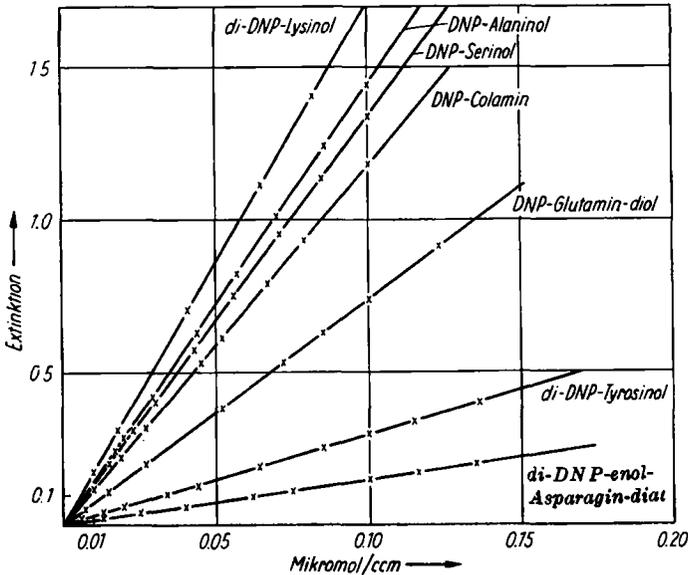


Abbildung 3. Kolorimetrische Eichkurven einiger DNP-Aminoalkohole bei 366 μ .

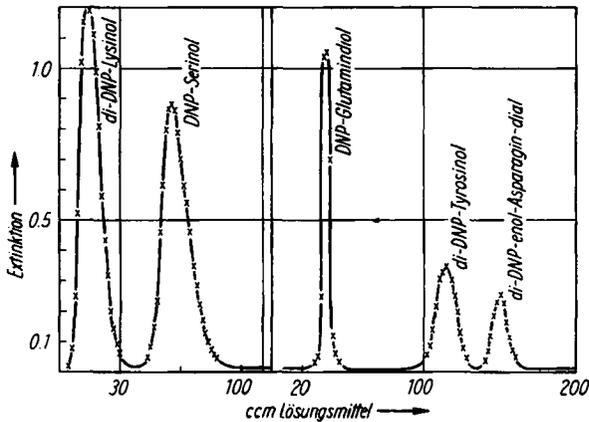


Abbildung 4. Säulenchromatographische Trennung verschiedener DNP-Aminoalkohole.
 a) α, ϵ -Di-DNP-Lysinol und DNP-Serinol; Lösungsmittel: Ligroin-Eisessig-Aceton 84: 8: 8.
 b) DNP-Glutamin-diol, *N,O*-Di-DNP-Tyrosinol und Di-DNP-Enol-asparagin-dial; Lösungsmittel: Ligroin-Eisessig-Aceton 82: 6: 12

DNP-Aminoalkohole bei 313 μ ³⁴⁾ auszuführen. Abbild. 4 zeigt eine quantitative Bestimmung der beschriebenen DNP-Verbindungen unter den im Versuchsteil näher ausgeführten Bedingungen. Die für die einzelnen Fraktionen erhaltenen Ausbeuten zeigt Tafel 2.

³⁴⁾ Im Kolorimeter „Eppendorf“ stehen zur Messung im UV die Wellenlängen 313, 334 und 366 μ zur Verfügung.

Tafel 2. Ausbeuten bei chromatographischer Trennung verschiedener DNP-Aminoalkohole (vergl. Abbild. 4)

DNP-Aminoalkohol	Einwaage (μ Mol)	Gefundene Menge (μ Mol)
Di-DNP-Enol-asparagin-dial	2.58*)	2.56
DNP-Glutamin-diol	1.00	1.009
DNP-Serinol	1.00	1.016
α, ϵ -Di-DNP-Lysinol	1.00	1.02
<i>N, O</i> -Di-DNP-Tyrosinol	1.50*)	1.482

*) Auf Grund der niedrigen Extinktionen bei 366 $m\mu$ wurde bei den Testversuchen für Di-DNP-Enol-asparagin-dial und *N, O*-Di-DNP-Tyrosinol eine größere Menge eingewogen.

Für die papierchromatographische Trennung der neu dargestellten DNP-Aminoalkohole waren die bereits von uns³⁾ veröffentlichten Lösungsmittel nicht in allen Fällen geeignet, da die Verbindungen entweder überhaupt nicht oder nur in geringem Maße, ohne sich genügend aufzutrennen, wanderten. Bei Wahl eines geeigneten Mischungsverhältnisses von Dekalin, 10-proz. Essigsäure und Isoamylalkohol (9:6:6), dem man 2 Tle. Glykolmonochlorhydrin zur besseren Abgrenzung der Flecken zusetzte, gelang es jedoch, gut abgesetzte Trennungen zu erzielen. In Tafel 4 sind die R_F -Werte der verschiedenen DNP-Aminoalkohole in den bereits bekannt gegebenen und dem neuen Entwicklungsgemisch angeführt.

Tafel 3. R_F -Werte einiger DNP-Aminoalkohole sowie von DNP-Leucin und 2,4-Dinitro-phenol

DNP-Aminoalkohol	Lösungsmittelgemisch			
	I	II	III	IV
α, ϵ -Di-DNP-Lysinol	0.00	0.00	0.00	0.49
<i>N, O</i> -Di-DNP-Tyrosinol	0.00	0.00	0.05	0.29
DNP-Serinol	0.00	0.00	0.09	0.41
Di-DNP-Enol-asparagin-dial	0.00	0.00	0.16	0.47
DNP-Glutamin-diol	0.00	0.00	0.20	0.55
DNP-Colamin	0.12	0.05	0.29	0.52
DNP-Alaninol	0.25	0.35	0.53	0.71
DNP-Prolinol	0.31	0.37	0.65	0.83
2,4-Dinitro-phenol	0.38	0.46	0.70	0.82
DNP-Aminobutanol	0.40	0.48	0.74	0.85
DNP-Valinol	0.88	0.84	0.77	0.87
DNP-Phenylalaninol	0.51	0.54	0.82	0.85
DNP-Leucinol	1.00	1.00	0.90	0.86
DNP-Leucin	1.00	1.00	0.92	0.90

Lösungsmittel: I. Dekalin: Eisessig: Isoamylalkohol 15:10:2, II. Dekalin: Eisessig: Nitrobenzol 9:6:1, III. Dekalin: 10-proz. Essigsäure: Isoamylalkohol 15:10:4, IV. Dekalin: 10-proz. Essigsäure: Isoamylalkohol: Glykolmonochlorhydrin 9:6:6:2.

Die R_F -Werte sind für die Gemische III und IV auf die Lösungsmittelfront bezogen. Für die Gemische I und II sind sie aber wegen der langsamen Wanderungsgeschwindigkeiten, die es oft notwendig machen, bei absteigender Chromatographie mit Durchlaufchromatogrammen zu arbeiten, auf DNP-Leucinol berechnet (vergl.³⁾), das im Gemisch I mit R_F 0.29, in II mit R_F 0.32 (bez. auf die Lösungsmittelfront) wandert.

Von sämtlichen Lösungsmitteln wird die obere Phase verwendet. Bei Lösungsmittel I beobachtet man manchmal ein nachträgliches Entmischen der oberen Phase, was sich sehr nachteilig auswirkt, wenn dies während des Chromatographierens eintritt. Man kann diesen Vorgang beschleunigen, indem man die obere Phase vor Gebrauch filtriert.

Wir benutzen die Gelegenheit, um zwei Druckfehler in unserer ersten Arbeit³⁵⁾ zu berichtigen (vergl. dazu ⁵⁾). Zur Darstellung von DNP-Colamin (S. 1481) wurden 1.8 g DNFB und nicht 0.8 g verwendet. Auf S. 1482 muß die Summenformel von DNP-Phenylalaninol $C_{15}H_{15}O_5N_3$ heißen. Die berechneten Analysenwerte lauten: C 56.78, H 4.77, N 13.24. Die dazu gefundenen Werte sind: C 57.07, H 5.06, N 13.39.

Sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Peptide wurden von Hrn. Dipl.-Chem. E. Wünsch angefertigt. Wir möchten ihm an dieser Stelle unseren herzlichen Dank aussprechen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir sehr für die Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der DNP-Aminoalkohole

DNP- γ -Glutamin-diol: 0.8 g *N*-Benzoyl- γ -glutaminsäure-dimethylester³⁵⁾ wurden in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst und unter starkem Rühren und äußerer Kühlung mit 3 g feingepulvertem Lithiumborhydrid versetzt. Nach 30stdg. Erhitzen bei Feuchtigkeitsausschluß und unter Rückfluß (Badtemperatur 75–80°) versetzte man nach dem Erkalten das Reaktionsgemisch mit 20 ccm wassergesätt. Butanol, das eine vollständige Abtrennung der Lithiumsalze erlaubte, filtrierte den Niederschlag ab und kochte ihn dreimal mit je 30 ccm Butanol aus. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. eingedampft. Der ölige Rückstand erstarrte beim Überschichten mit Äther und längerem Stehenlassen. Es wurde mehrmals mit Äther unter Erwärmen extrahiert und die Ätherauszüge soweit eingedampft, bis sich feine weiße Nadeln des *N*-Benzoyl- γ -glutamin-diols abschieden. Schmp. 85°; Ausb. 0.645 g (92.5% d. Th.).

$C_{12}H_{17}O_3N$ (223.3) Ber. C 64.55 H 7.23 N 6.27 Gef. C 64.28 H 7.49 N 6.01

0.5 g *N*-Benzoyl- γ -glutamin-diol wurden 8 Stdn. in 25-proz. Salzsäure hydrolysiert. Nach dem Erkalten schieden sich Nadeln von Benzoesäure ab (Ausb. 0.211 g = 87.7% d. Th.). Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt; es hinterließ ein helles Öl, welches in 10 ccm Wasser aufgenommen und mit 0.8 g DNFB in 20 ccm Alkohol und 1 g $NaHCO_3$ 3 Stdn. geschüttelt wurde. Nach Entfernen von überschüss. DNFB mit 0.2 g Glykokoll (2 Stdn. Schütteln), weitgehendem Verdampfen des Alkohols i. Vak. und Ausäthern der mit Wasser verdünnten Restlösung erhielt man 0.549 g (89.9% d. Th.), die aus Wasser in gelben Nadeln vom Schmp. 103° kristallisierten.

$C_{11}H_{16}O_6N_3$ (285.3) Ber. C 46.31 H 5.29 N 14.90 Gef. C 46.35 H 5.48 N 14.72

α, ϵ -Di-DNP- γ -Lysinol: 0.5 g γ -Lysin-dihydrochlorid wurden mit Methanol und Salzsäure in der Kälte verestert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Esterhydrochlorid in Methanol gelöst und mit 110 mg Natrium, in Methanol gelöst, versetzt. Nach Abtrennen von Kochsalz wurde i. Vak. eingedampft und der ölige Rückstand in 50 ccm absol. Äther suspendiert. Zu der Suspension ließ man langsam eine Lösung von 0.5 g Lithiumaluminiumhydrid in 50 ccm Äther unter Rühren zutropfen und rührte das Reaktionsgemisch 2 Stdn. Danach wurde weitere 10 Stdn. auf dem Wasserbad bei 40° unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt. Hierauf zersetzte man das überschüss. Lithiumaluminiumhydrid, indem man unter Rühren tropfenweise 5 ccm Wasser zugab und trennte Niederschlag und Ätherlösung. Der Niederschlag der Metallhydroxyde wurde dreimal mit Alkohol ausgekocht und der Eindampfrückstand in 5 ccm Wasser aufgenommen.

³⁵⁾ M. Bergmann u. L. Cervas, J. biol. Chemistry 118, 341 [1936].

Zur Isolierung wurde Lysinol, wie bei DNP-Glutamin-diol beschrieben, in die DNP-Verbindung übergeführt. Das ölige Produkt bildete, aus Wasser-Alkohol umkristallisiert, feine hellgelbe Nadeln vom Schmp. 71°. Ausb. 750 mg (51.4% d.Th.).

$C_{15}H_{20}O_6N_6$ (454.4) Ber. C 45.37 H 4.43 N 18.49 Gef. C 45.32 H 4.53 N 18.72

DNP-DL-Serinol: 0.5 g *N*-Benzoyl-DL-serin-methylester²⁶⁾ wurden in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran aufgeschlämmt und, wie bei DNP-Glutamin-diol beschrieben, mit 2 g feingepulvertem Lithiumborhydrid reduziert, die Borkomplexe mit Butanol zersetzt und extrahiert. Der nach dem Verjagen des Lösungsmittels verbliebene Rückstand an *N*-Benzoyl-DL-serinol wurde aus Äther umkristallisiert. Es bildeten sich feine weiße Nadeln vom Schmp. 122°. Ausb. 0.396 g (85.9% d.Th.).

$C_{10}H_{13}O_3N$ (195.2) Ber. C 61.52 H 6.71 N 7.17 Gef. C 61.48 H 6.82 N 6.95

0.3 g *N*-Benzoyl-DL-serinol wurden 8 Stdn. mit 25-proz. Salzsäure hydrolysiert. Nach Abtrennung der nach dem Erkalten abgeschiedenen Benzoesäure (0.171 g, 91.5% d.Th.) wurde das Filtrat i. Vak. eingedampft und der Rückstand, wie beschrieben³⁾, mit DNFB umgesetzt. Nach dem Entfernen von überschüss. DNFB mit Glykokoll und üblicher Aufarbeitung blieben 0.366 g (93.2% d.Th.), die aus Alkohol-Wasser feine gelbe Nadeln vom Schmp. 128° bildeten.

$C_9H_{11}O_6N_3$ (257.2) Ber. C 42.02 H 4.31 N 16.33 Gef. C 42.04 H 4.31 N 16.34

DNP-DL-2-Amino-butanol-(1) aus DL-Methionin: 500 mg Methionin wurden, wie mehrfach beschrieben, mit 10 ccm Methanol und 2 ccm Essigester verestert und acetyliert. Umkristallisation aus Methanol-Äther; 0.592 g (91.4% d.Th.) feine weiße Blättchen vom Schmp. 96°.

$C_8H_{15}O_3NS$ (205.3) Ber. C 46.83 H 7.31 N 6.82 S 15.60

Gef. C 46.76 H 7.25 N 6.94 S 15.80

300 mg Acetyl-methionin-methylester wurden wie üblich mit 1.5 g Lithiumborhydrid reduziert und mit DNFB umgesetzt. Die Verbindung wurde durch Chromatographie an Kieselsäure-Celite¹⁹⁾ (4:1, Säulendurchmesser 15 mm, Höhe 200 mm) mit dem Lösungsmittel 94 Tle. Ligroin, 4 Tle. Eisessig, 2 Tle. Aceton gereinigt, wobei die zuerst austretende Hauptfraktion von nachziehenden Anteilen abgetrennt wurde. 316 mg (88.7% d.Th.); Schmp. 101°. Der Misch-Schmp. mit DNP-DL-2-Amino-butanol-(1), dargestellt aus DL- α -Amino-buttersäure, war nicht erniedrigt.

DNP-DL-2-Amino-butanol-(1) aus DL- α -Amino-buttersäure: 500 mg DL- α -Amino-buttersäure wurden nach Vogl und Pöhm²²⁾ mit 1 g Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Nach dem Zerstören der Aluminiumkomplexe mit feuchtem Äther wurde der Aminoalkohol in üblicher Weise als DNP-Derivat isoliert und aus Wasser-Alkohol umkristallisiert; Schmp. 101°. Ausb. 1.06 g (85.5% d.Th.).

$C_{10}H_{13}O_5N_3$ (255.2) Ber. C 47.06 H 5.13 N 16.17 Gef. C 46.85 H 5.19 N 16.46

N-DNP- β -O-DNP-Dienol-aminosuccin-dialdehyd (III) aus Asparaginsäure (Di-DNP-Enol-asparagin-dial): Eine Lösung von 0.5 g Asparaginsäure-dimethylester in 25 ccm absol. Äther wurde tropfenweise zu einer äther. Lösung von 0.8 g LiAlH₄ gegeben. Nach 2stdg. Stehenlassen wurde das Gemisch mit 10 ccm feuchtem Äther zersetzt und die Ätherlösung abgetrennt. Der Aluminiumhydroxydschlamm wurde noch mehrmals mit Alkohol extrahiert und der nach dem Verdampfen der Äther- und Alkoholfiltrate verbliebene Rückstand in 30 ccm 66-proz. Alkohol mit 0.8 g DNFB und 1 g NaHCO₃ 3 Stdn. geschüttelt. Der Überschuß an DNFB wurde durch Schütteln mit 0.2 g Glykokoll zerstört und die Lösung nach weitgehendem Verdampfen des Alkohols i. Vak. und Verdünnen mit Wasser ausgeäthert. Nach Umkristallisieren aus Alkohol erhielt man 1.12 g hellgelbe Nadeln (69% d.Th.).

$C_{16}H_{11}O_{10}N_5 \cdot 2C_2H_5O$ (525.4) Ber. C 45.71 H 4.41 N 13.33 NO₂ 35.02

Gef. C 46.10 H 4.38 N 13.05 NO₂ 35.50, 35.99

Bei der Titration der Nitrogruppen mit $n_{/100}$ TiCl₃²³⁾ wurde mit Rücksicht auf die vorhandene enolische Oxygruppe an Stelle von Eisen(II)-Lösung mit $n_{/100}$ Methylenblau zurücktitriert.

²⁶⁾ E. Erlenmeyer jun. u. F. Stoop, Liebigs Ann. Chem. **337**, 236 [1904].

Endgruppenbestimmungen im präparativen Ausmaß

Glycyl-L-asparaginsäure: 2 g Glycyl-L-asparaginsäure wurden mit 50 cm Methanol und 10 cm Acetanhydrid versetzt und 20 Stdn. stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde auf dem Wasserbad verdampft, der Rückstand wieder mit Methanol aufgenommen und nochmals verdampft. Diese Operation wurde mehrmals wiederholt, bis kein Geruch von Essigsäure mehr wahrnehmbar war. Der Rückstand wurde über Kaliumhydroxyd scharf getrocknet und aus heißem Toluol umkristallisiert. Nach längerem Stehenlassen schied sich der *N*-Acetyl-glycyl-L-asparaginsäure-dimethylester in feinen weißen Kristallen vom Schmp. 107° ab. Ausb. 2.49 g (90.8% d.Th.).

$C_{10}H_{16}O_6N_2$ (260.2) Ber. C 46.14 H 6.19 N 10.76 Gef. C 45.96 H 6.26 N 10.75

1 g *N*-Acetyl-glycyl-asparaginsäure-dimethylester wurde in 50 cm absol. Tetrahydrofuran aufgeschlämmt und unter starkem Rühren und äußerer Kühlung mit 4 g feingepulvertem Lithiumborhydrid versetzt. Nach 30stdg. Erhitzen unter Feuchtigkeitsschluß und unter Rückfluß (Badtemperatur 75–80°) versetzte man nach dem Erkalten mit 125 cm Alkohol und etwas Wasser, filtrierte den Niederschlag ab und kochte ihn dreimal mit je 50 cm Alkohol aus. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels hinterblieb ein Öl, welches mit 2*n* HCl aufgenommen und 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht wurde. Dann wurde i. Vak. eingengt und der Rückstand mit 2 g Natriumhydrogencarbonat, 20 cm Wasser und einer Lösung von 0.8 g DNFB in 20 cm Alkohol 5 Stdn. unter mehrmaligem Umschütteln stehengelassen. Hierauf wurde zur Entfernung von überschüss. DNFB 0.2 g Alanin zugegeben. Nach weiterem 3stdg. Stehenlassen wurde i. Vak. bei 40° vom Alkohol befreit und mit Wasser versetzt. Das Reaktionsprodukt wurde ausgeäthert und der Ätherauszug i. Vak. zur Trockne eingedampft. Ausb. 0.834 g (50% d.Th.). Das Produkt konnte, vermutlich infolge geringer Verunreinigungen aus der Säulenfüllung, nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Die papierchromatographische Untersuchung im Lösungsmittel Dekalin-10-proz. Essigsäure-Isoamylalkohol 15:10:4 zeigte keine Verunreinigung an, der R_F -Wert stimmte mit Di-DNP-Enol-asparagin-dial, das zum Vergleich nebenherlief, überein. Das Absorptionsspektrum war mit dem von Di-DNP-Enol-asparagin-dial identisch. Die wäßr. Mutterlauge zeigte bei chromatographischer Untersuchung nur DNP-Glycin und DNP-Alanin (Alanin wurde zur Beseitigung von überschüss. DNFB zugegeben); Verunreinigungen traten keine auf.

L-Valyl-glycyl-L-lysin: 100 mg L-Valyl-glycyl-L-lysin wurden, wie bei Glycyl-L-asparaginsäure beschrieben, acetylierend verestert. Der entstandene *N*-Acetyl-valyl-glycyl-lysin-methylester wurde mit 500 mg Lithiumborhydrid in 20 cm Tetrahydrofuran reduziert und anschließend hydrolysiert. Das gebildete Lysinol wurde wie bei Glycyl-asparaginsäure als α,ϵ -Di-DNP-Lysinol isoliert. Ausb. (roh) 142 mg (89.4% d.Th.).

Die papierchromatographische Untersuchung im Lösungsmittel Dekalin-10-proz. Essigsäure-Isoamylalkohol-Glykolmonochlorhydrin (9:6:6:2) zeigte keine Verunreinigung an. Der R_F -Wert stimmte mit α,ϵ -Di-DNP-Lysinol, das zum Vergleich nebenherlief, überein. Nach Umkristallisation aus Wasser-Alkohol schmolzen die hellgelben Kristalle bei 71°. Der Misch-Schmp. mit Di-DNP-Lysinol war nicht erniedrigt.

Die wäßr. Mutterlauge zeigte bei chromatographischer Untersuchung DNP-Glycin, DNP-Valin und DNP-Alanin (Alanin war zur Beseitigung von überschüss. DNFB zugegeben worden). Verunreinigungen traten keine auf.

Mikroendgruppenbestimmungen

Glycyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäure: 10 mg des Tripeptides wurden mit 5 cm Methanol und 0.5 cm Acetanhydrid 20 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei eine klare Lösung entstand. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels i. Vak. hinterblieb ein öliger Rückstand, der in 5 cm Tetrahydrofuran aufgenommen und nach Zugabe von 40 mg $LiBH_4$ 30 Stdn. unter Rückfluß erhitzt wurde. Nach Zersetzen mit 5 cm wassergesättigtem Butanol, das eine bessere Abtrennung der Lithiumsalze als Äthanol ermöglicht, wurde filtriert und der Rückstand dreimal mit Butanol

ausgekocht. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. verdampft und mit $2n$ HCl 8 Stdn. hydrolysiert. Nach dem Abdampfen der Säure i. Vak. führte man das Glutamin-diol durch 3stdg. Stehenlassen mit 5 mg DNFB und 50 mg NaHCO_3 in 60-proz. Alkohol in das DNP-Derivat über und zersetzte überschüss. DNFB mit 10 mg Alanin. Dann wurde der Alkohol abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand ergab bei papierchromatographischer Untersuchung im Lösungsmittel Ligroin-10-proz. Essigsäure-Isoamylalkohol-Glykolmonochlorhydrin 9:6:6:2 als einzigen Fleck DNP-Glutamin-diol, das mit einer parallel laufenden Vergleichsprobe identifiziert wurde. Nach Chromatographie an Kieselgur-Celite (4:1) mit dem Gemisch Ligroin-Eisessig-Aceton (75:15:10) wurde die Ausbeute zu 7.35 mg (90.7% d.Th.) kolorimetrisch bestimmt.

Die wäbr. Mutterlauge ergab bei papierchromatographischer Auftrennung im System 5 Tle. Toluol, 1 Tl. Pyridin, 3 Tle. Glykolmonochlorhydrin und 3 Tle. $0.8n\text{NH}_3$ ⁸⁷⁾ nur DNP-Glykokoll und DNP-Phenylalanin neben dem zur Entfernung von überschüssigem DNFB gebildeten DNP-Alanin.

Glycyl-L-leucyl-L-glutaminsäure: Der Abbau wurde analog, wie bei Glycyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäure beschrieben, mit 10 mg Substanz durchgeführt. Die papierchromatographische Auftrennung des alkalischen Ätherauszuges der DNP-Verbindungen ergab neben DNP-Glutamin-diol noch etwas DNP-Leucin. Die wie oben nach säulenchromatographischer Aufarbeitung bestimmte Ausbeute an Glutamin-diol betrug 7.95 mg (87.2% d.Th.).

Die wäbr. Mutterlauge zeigte bei papierchromatographischer Untersuchung DNP-Leucin, DNP-Glykokoll und DNP-Alanin, das zur Entfernung von DNFB zugegeben worden war.

L-Leucyl-glycyl-glycin: Der Abbau wurde analog, wie bei Glycyl-phenylalanyl-glutaminsäure beschrieben, mit 20 mg Substanz durchgeführt. Die papierchromatographische Auftrennung des Ätherauszuges ergab neben DNP-Colamin noch DNP-Leucin. Letzteres wurde nach säulenchromatographischer Auftrennung durch elektrophoretische Wanderung identifiziert. Die Ausbeute an DNP-Colamin betrug 16.7 mg (90% d.Th.).

Die wäbr. Mutterlauge zeigte bei chromatographischer Auftrennung DNP-Glykokoll, DNP-Leucin und DNP-Alanin (zur Entfernung von DNFB zugegeben).

Bestimmung der Carboxyl-Endgruppe von Insulin

1. Nach acetylierender Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid: 4.1 mg Insulin (Farbwerke Hoechst, dreimal umkristallisiert) wurden mit 5 ccm Methanol und 1 ccm Acetanhydrid versetzt. Nach 24 Stdn. wurde abgesaugt und mehrmals mit Methanol zur Beseitigung des überschüss. Acetanhydrids gewaschen. Sodann wurde noch einige Male mit Äther nachgewaschen und i. Vak. über KOH scharf getrocknet. Das Produkt wurde in 15 ccm absol. Tetrahydrofuran suspendiert und unter starkem Rühren und äußerer Kühlung mit 10 mg LiBH_4 versetzt. Nach 30stdg. Erhitzen auf dem Wasserbade bei Feuchtigkeitsausschluß wurden dem Reaktionsgemisch nach dem Erkalten 5 ccm 5-proz. Salzsäure zum Zersetzen des überschüss. LiBH_4 zugegeben. Die Lösung wurde i. Vak. zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit 5 ccm 12.5-proz. Salzsäure aufgenommen und 8 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach der Hydrolyse wurde i. Vak. eingeeengt, mit Wasser aufgenommen und mit NaHCO_3 auf p_{H} 8.0–8.5 gebracht. Sodann wurde eine Lösung von 15 mg DNFB in 4 ccm Alkohol zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 Stdn. geschüttelt. Das überschüss. DNFB wurde durch Zugabe von 30 mg Glykokoll, gelöst in 1 ccm Wasser, und weiteres 5stdg. Schütteln zerstört. Dann wurde i. Vak. bei 40° vom Alkohol befreit, mit Wasser versetzt und fünfmal mit 20 ccm Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit Calciumchlorid getrocknet und i. Vak. zur Trockene eingedampft.

Der Rückstand wurde in 2.5 ccm Essigester aufgenommen und 0.5 ccm davon auf eine Säule von Kieselgur-Celite (4:1, Höhe 100 mm)¹⁹⁾ aufgetragen. Nach Eluieren mit 25 ccm eines Gemisches von 94 Tln. Ligroin, 4 Tln. Eisessig und 2 Tln. Aceton und an-

⁸⁷⁾ G. Biserte u. R. Osteux, Bull. Soc. Chim. biol. **33**, 50 [1951].

schließend 70 ccm 88 Tln. Ligroin, 2 Tln. Eisessig, 10 Tln. Aceton konnten 3 Fraktionen getrennt isoliert werden, von denen sich die ersten beiden papier-elektrophoretisch (Veronalpuffer p_H 8.3) und papierchromatographisch (Dekalin-Eisessig-Isoamylalkohol 15:10:2) als DNP-Leucin und 2.4-Dinitrophenol erwiesen, während die dritte in Papierchromatogrammen (Dekalin-10-proz. Essigsäure-Isoamylalkohol 15:10:4) mit DNP-Alaninol parallel lief. Die aus den Extinktionswerten der DNP-Alaninolfraktion des aliquoten Teiles errechnete Ausbeute beträgt $0.188 \mu\text{Mol}$, was bezogen auf den gesamten Ansatz 2.39 Endgruppen auf 100 Aminosäuren entspricht. (N von Insulin 15.7%, Gesamt-N: α -Peptid-N 116:100, vergl.¹⁴.)

2. Ohne Veresterung: 6.5 mg Insulin wurden wie oben, jedoch ohne Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid, behandelt. Die papier- und säulenchromatographische Untersuchung ergab dieselben Fraktionen wie das veresterte Material, doch betrug die Ausbeute an DNP-Alaninol nur $0.31 \mu\text{Mol}$, entspr. 0.482 Mol%, das sind 20% der nach Veresterung gefundenen Menge.

Säulenchromatographische Trennung der beschriebenen DNP-Aminoalkohole

In die zur Trennung verwendete Säule wurde nach der von uns bereits gegebenen Vorschrift¹⁹ ein Gemisch von Kieselgur-Celite (4:1) 100 mm hoch eingeschlämmt (Säulendurchmesser 9 mm). Nach dem üblichen Vorwaschen (vergl.¹⁹) wurde von DNP-Glutamin-diol, Di-DNP-Lysinol und DNP-Serinol je ein μMol , von Di-DNP-Tyrosinol $1.5 \mu\text{Mol}$ und von Di-DNP-Enol-asparagin-dial $2.58 \mu\text{Mol}$ (vergl. Anm. in Tafel 2) zusammen in 1 ccm Essigester gelöst, auf die Säule aufgebracht und durch ein Gemisch, bestehend aus 10 Tln. Eisessig, 15 Tln. Essigester und 75 Tln. Ligroin (Sdp. 80–90°), in zwei Gruppen getrennt. DNP-Glutamin-diol, Di-DNP-Tyrosinol und Di-DNP-Enol-asparagin-dial wanderten als einheitliche Fraktion durch die Säule, während Di-DNP-Lysinol und DNP-Serinol sitzen blieben. Sie wurden mit einem Gemisch aus 8 Tln. Eisessig, 8 Tln. Aceton und 84 Tln. Ligroin getrennt, wobei als erstes Di-DNP-Lysinol und anschließend DNP-Serinol aus der Säule trat. Die zuerst abgetrennten DNP-Derivate von Glutamin-diol und Tyrosinol sowie Di-DNP-Enol-asparagin-dial konnten an einer eben-solchen Säule mit einem Gemisch aus 6 Tln. Eisessig, 12 Tln. Aceton und 82 Tln. Ligroin entwickelt werden und traten in der Reihenfolge DNP-Glutamin-diol, Di-DNP-Tyrosinol, Di-DNP-Enol-asparagin-dial aus der Säule (Abbild. 4). Die einzelnen Fraktionen wurden kolorimetrisch bei $366 m\mu$ bestimmt.

Liegen die beschriebenen DNP-Verbindungen im Gemisch mit anderen DNP-Aminoalkoholen vor, so empfiehlt es sich, zuerst die anderen Vertreter nach der von uns gegebenen Anweisung¹⁹ aufzutrennen und nach dem Austritt von DNP-Colamin die verbleibende Fraktion, welche nur mehr die in dieser Arbeit beschriebenen DNP-Aminoalkohole enthält, mit Eisessig aus der Säule zu waschen und, wie oben beschrieben, getrennt aufzuarbeiten.

Säulenchromatographische Trennung von DNP-Leucinol und DNP-Leucin sowie von DNP-Valinol und Dinitrophenol: 7.5 g Kieselgur wurden mit einer Mischung von 90 ccm Essigester und 3 ccm wäßriger $0.1 m \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung gut verrührt. Sodann wurde das Gemisch in kleinen Portionen unter Druck in eine Säule von 9 mm Durchmesser eingeschlämmt. Das zu trennende Gemisch wurde in Essigester gelöst, auf die Säule aufgebracht und mit Essigester, der mit wäßriger $0.1 m \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung gesättigt ist, entwickelt. Die in kurzer Zeit wieder aus der Säule austretenden DNP-Aminoalkohole wurden aufgefangen und kolorimetrisch bei $366 m\mu$ bestimmt. Nach Aufgabe von $1.43 \mu\text{Mol}$ DNP-Leucinol im Gemisch mit DNP-Leucin wurden $1.367 \mu\text{Mol}$ wieder gewonnen, von $1 \mu\text{Mol}$ DNP-Valinol neben Dinitrophenol $0.982 \mu\text{Mol}$.

Ausschütteln eines Gemisches von 8 DNP-Aminosäuren mit Äther und Essigester bei verschiedenem p_H : 3.5 mg DNP-Leucin, 3 mg DNP-Arginin, 4.8 mg DNP-Threonin, 4.7 mg DNP-Glycin, 1.7 mg α , β -im-Di-DNP-Histidin, 6.1 mg DNP-Alanin, 2.2 mg DNP-Phenylalanin und 2.1 mg DNP-Valin wurden in 20 ccm

Wasser gelöst. Die Lösung wurde halbiert und die erste Hälfte bei verschiedenem p_H mit Äther, die zweite mit Essigester ausgeschüttelt. In den Extrakten fand sich nur DNP-Leucin, wie papierchromatographisch mit dem Lösungsmittel 5 Tln. Toluol, 1 Tl. Pyridin, 3 Tln. Glykolmonochlorhydrin, 3 Tln. $0.8nNH_3$ ³⁷⁾ festgestellt wurde. Die kolorimetrisch bei $366 m\mu$ bestimmten Mengen DNP-Leucin zeigt Tafel 4.

Tafel 4. Extrahierbares DNP-Leucin
aus alkalischer wäßriger Lösung
(10 ccm, $c = 0.035\%$) in μ Mol

p_H	Ätherextrakt (2 × 10 ccm)	Essigesterextrakt (2 × 10 ccm)
13	0.24	1.02
10	0.26	1.37
9	0.68	1.43
8	0.845	1.556
7	1.00	1.80

19. Jan Thesing und Dietger Witzel: Die Umsetzung von Acylcyaniden mit Phenylhydrazin (I. Mittel. über Hydrazin- und Hydroxylamin-Derivate)

[Aus dem Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt]
(Eingegangen am 10. November 1954)

Während Acylcyanide in ätherischer oder wäßrig-essigsaurer Lösung mit Phenylhydrazin unter Cyanwasserstoff-Abspaltung β -Acylphenylhydrazine liefern, erhält man in mineral-saurer Lösung die bisher nur auf Umwegen zugänglichen Acylcyanid-phenylhydrazone. Es wird ein Mechanismus angegeben, der den den Reaktionsverlauf entscheidenden Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration bei diesen und anderen analogen Umsetzungen von Acylcyaniden mit nucleophilen Reaktionspartnern erklärt.

Eine Anzahl *cis-trans*-isomerer Acylcyanid-phenylhydrazone, deren Konfiguration mit Hilfe ihrer UV- und IR-Spektren ermittelt wurde, werden beschrieben.

Schon aus älteren Arbeiten ist bekannt, daß Acylcyanide analog den Acylhalogeniden eine Reihe von nucleophilen Reaktionspartnern unter Abspaltung von Cyanwasserstoff am Sauerstoff¹⁾, Stickstoff^{2, 4, 5)} oder Kohlenstoff³⁾ im

¹⁾ a) Hydrolyse von Acylcyaniden: Vergl. z.B. H. Hübner, Liebigs Ann. Chem. **120**, 335 [1861]; b) Alkohololyse: W. Cocker, A. Lapworth u. A. T. Peters, J. Amer. chem. Soc. **19**, 894 [1898]; A. Lachmann, ebenda **45**, 1522 [1923]; K. Kindler u. W. Peschke, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **269**, 583 [1931].

²⁾ Umsetzung von Acylcyaniden mit a) Ammoniak: V. Migrdichian, The Chemistry of organic cyanogen Compounds (Reinhold Publishing Corp., New York 1947), S. 131; b) Aminen: J. Gardent, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **286**, 2249 [1953]; A. Dornow u. H. Theidel, Angew. Chem. **66**, 605 [1954]; c) Hydroxylamin: A. Müller, Ber. dtsch. chem. Ges. **16**, 1621 [1883].

³⁾ Umsetzung von Acylcyaniden mit a) Acetanhydrid: E. Müller, Liebigs Ann. Chem. **491**, 264 [1931]; b) Indolen: A. K. Kiang u. F. G. Mann, J. chem. Soc. [London] **1953**, 594; c) metallorganischen Verbindungen: vergl. z.B. R. Adams, H. B. Bramlet u. F. H. Teudick, J. Amer. chem. Soc. **42**, 2373 [1920].

⁴⁾ a) Ber. dtsch. chem. Ges. **21**, 2999 [1888] Anm.; b) G. Favrel, Bull. Soc. chim. France [3] **27**, 193 [1902]. ⁵⁾ G. Favrel, Bull. Soc. chim. France [3] **19**, 8 [1898].