

138. Theodor Wieland und Wilhelm Bartmann¹⁾: Zur Kenntnis der Aminothiosäuren und Thiopeptide (IV. Mitteil.²⁾)

[Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 13. Dezember 1955)

Es wird eine Standardmethode zur Darstellung von α -Aminothiosäuren angegeben, die bis zu 80% Ausbeute liefert. Auf ähnliche Weise können die Thiopeptide Glycyl-thiovalin und Glycyl-valyl-thioisoleucin synthetisiert werden. Einige *N*-substituierte Aminothiosäuren sowie die freien Verbindungen, in Gegenwart von HCO_3^- , sind zur Peptidsynthese befähigt. Studien zum isoelektrischen Verhalten der Aminothiosäuren und solche über ihre Oxydationsprodukte mit Jod werden mitgeteilt. Mit Hilfe röntgengoniometrischer Aufnahmen wird ein weiterer Einblick in die Natur der gemischten Kristallisate aus Aminothiosäuren mit Aminosäuren erhalten.

Über Aminothiosäuren wurde in drei früheren Arbeiten^{2, 3, 4)} aus unserem Institut berichtet. Die ursprünglich angewandte Darstellungsmethode, Umsetzung eines Aminoacyl-thiophenol-hydrochlorides mit Schwefelwasserstoff in Gegenwart einer Base, hat sich im Prinzip auch weiterhin bewährt und konnte nun zu einem Standardverfahren ausgearbeitet werden. Hierbei wird als Lösungsmittel Methanol, als Base Triäthylamin verwendet und nach Auffällung des Triäthylamin-hydrochlorids durch Äther in die Lösung bei Zimmertemperatur ausgiebig H_2S eingeleitet. Im Eisschrank kristallisieren danach die Aminothiosäuren in 70–80-proz. Ausbeute aus.

Wir haben die Untersuchung dieser S-Analoga von Aminosäuren nach der physikalischen und chemischen Richtung hin fortgesetzt und einige neue Erkenntnisse über die Zwitterionennatur, die Reaktionsfähigkeit der COS^- -Gruppe mit nucleophilen Stoffen und Oxydationsmitteln und über das Phänomen der gemeinsamen Kristallisation von Aminothiosäuren mit Aminosäuren gewonnen, über die hier berichtet werden soll. Es ist uns ferner gelungen, nach derselben Methode je ein Di- und ein Tripeptid mit der COS^- -Endgruppe darzustellen und so die Körperklasse der Terminal-Thiopeptide*) zu erschließen.

Ferner zeigen wir am *N*-Carbobenzoxy(Cbo)-thioglycin, daß man diese für Peptidsynthesen als Reagens zur Aminoacylierung brauchbare Verbindung besser durch Thiohydrolyse des Phenylthiocesters (a) als nach der Anhydridmethode (b) erhält, die von anderer Seite⁵⁾ für die Darstellung von *N*-Acylaminothiosäuren benutzt wurde.

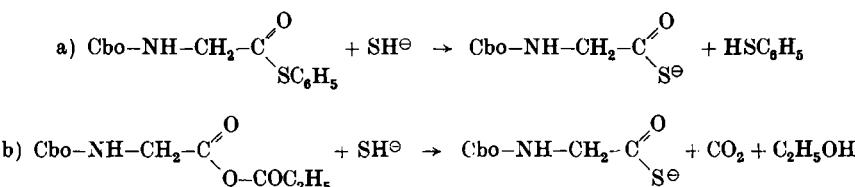
1) Dissertation. W. Bartmann, Universität Frankfurt a. M. 1955.

2) III. Mitteil.: Th. Wieland u. K. Freter, Chem. Ber. 87, 1099 [1954].

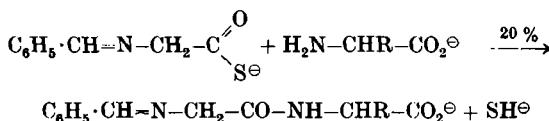
3) Th. Wieland u. D. Sieber, Naturwissenschaften 40, 242 [1953].

4) Th. Wieland, D. Sieber u. W. Bartmann, Chem. Ber. 87, 1093 [1954].

*) Diese sollen als T-Thiopeptide bezeichnet werden, im Gegensatz zu den bisher unbekannten Thiopeptiden mit einer oder mehreren CS–NH-Bindungen, für die wir die Bezeichnung Endo-Thiopeptide (E-Thiopeptide) vorschlagen.



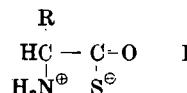
Der in alkalischem Medium durchführbare Schutz der Aminogruppe durch Umsetzung mit Benzaldehyd zur Benzalverbindung befreit die Aminothiosäure ebenfalls aus der Zwitterionenstruktur, so daß sie als Acylierungsreagens geeignet wird. Die bei der Reaktion mit einer zweiten Aminosäure erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nicht so befriedigend, daß man die Methode zur Peptidsynthese empfehlen könnte.



Das Benzaldipeptid läßt sich allerdings äußerst schonend, durch sehr verdünnte Säure in der Kälte, zu Benzaldehyd und Dipeptid spalten⁶⁾.

Isoelektrisches Verhalten der Aminothiosäuren

Hierüber gibt in einfacher Weise die Papierelektrophorese⁷⁾ bei verschiedenen p_{H} Aufschluß. Wir finden, daß Thioalanin noch bei p_{H} 1.9 an der Auftragstelle sitzen bleibt, während die S-freie Muttersubstanz weit zur Kathode wandert. Dieses unterschiedliche Verhalten, das zur bequemen Trennung der sonst recht ähnlichen Verbindungen herangezogen werden kann, beweist die um vieles geringere Basizität des COS^\ominus -Ions gegenüber dem CO_2^\ominus -Ion. Das Zwitterion (I) addiert auch bei relativ hoher H^\ominus -Konzentration kein Proton und läßt sich erst bei einem $p_{\text{H}} < 1$ zum Kation der Thiosäure entladen. Versuche, durch Eindampfen des Thiovalins mit der berechneten Menge wäßriger $2n$ HCl im Exsiccator das Thiovalin-hydrochlorid zu bereiten, ergaben einen chlorkreinen kristallinen Rückstand der unveränderten Aminothiosäure. Der in I dargestellte Zustand bleibt bei Zugabe von OH^\ominus bis zum $p_{\text{H}} < 8$ erhalten, was aus ultraviolettspektroskopischen Untersuchungen hervorgeht. Im stärker alkalischen Gebiet reagiert die $-\text{NH}_3^\ominus$ -Gruppe in üblicher Weise mit Hydroxylionen zu $-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$, wobei sich das spektrale Verhalten (maximale Absorption bei $250 \text{ m}\mu$) nicht ändert, da es von der Thiocarboxylatgruppe (wie in I) beherrscht wird.



⁵⁾ J. Sheehan u. D. Johnson, M. Cronyn u. J. Jiu, J. Amer. chem. Soc. 74, 4726 [1952].

⁶⁾ M. Bergmann, H. Enßlin u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 1034 [1925].

⁷⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, Angew. Chem. 67, 257 [1955].

In den früheren Mitteilungen dieser Reihe wurde die UV-Absorption der Aminothiosäuren (Maximum bei $250 \text{ m}\mu$) mit der gleichen des Thioharnstoffs verglichen und hieraus der Schluß auf das Vorliegen des $-\text{C}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{S}^{\ominus}}{\text{S}}}$ -Zustands gezogen. Wir möchten aber jetzt doch ein starkes Überwiegen der Grenzstruktur $-\text{C}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{S}^{\ominus}}{\text{S}}}$ (beim Thioharnstoff $-\text{C}=\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{S}^{\ominus}}{\text{S}}}$) annehmen, da sonst der große Unterschied im isoelektrischen Bereich gegenüber den Aminosäuren mit der mesomeren Anionenstruktur $-\text{C}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}}$ nicht verständlich wäre.

In diesem symmetrischen Ion ist ja die wirksamste Mesomerie und damit die größte Beständigkeit zu erwarten, die sich durch Anlagerung eines Protons nur ungern aufheben läßt. Wenn nun das S-haltige Anion der Aminothiosäuren noch weniger basisch ist, sogar in mineralsaurer Lösung kein Proton addiert, so muß man in ihm das weniger protophile $-\text{S}^{\ominus}$ hierfür verantwortlich machen. Das Anion der Thiocessigsäure hat sein Absorptionsmaximum in Wasser etwa bei derselben Wellenlänge (s. Abbild. 1), besitzt also wohl dasselbe Strukturelement.

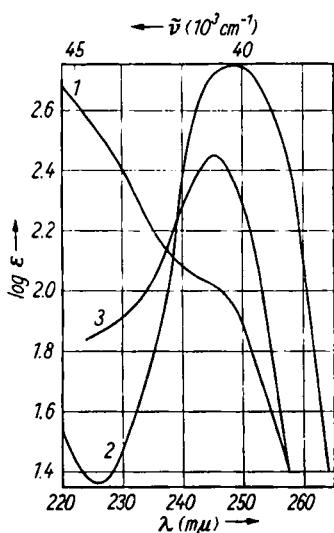
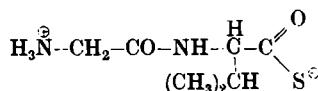


Abbildung 1. Absorptionsspektren von Thiocessigsäure in Methanol (1), in 0.04n NaOH (2) und in Wasser (3)

Die Frage nach dem Zustand der Thiocarboxylgruppe eines T-Thiodi- und -tripeptids haben wir nicht exakt



beantworten können. Zwar zeigt Glycylthiovalin in Wasser neben der maximalen Absorption bei $250 \text{ m}\mu$ im kürzeren Wellenbereich, wo die $-\text{COSH}$ -Gruppe stärker absorbiert, ebenfalls etwas höhere Absorption als die Aminothiosäure, zwar ist auch bei $p\text{H} 1.9$ bei dieser Verbindung eine deutliche kathodische Wanderung bei der Papierelektrophorese zu beobachten, was ebenfalls auf einen größeren Anteil des Kations mit $\text{H}_3\text{N}^{\oplus}$ - und $-\text{COSH}$ schließen läßt, doch blieben die Versuche, durch Erhitzen eine Polykondensation oder nennenswerte Diketopiperazinbildung herbeizuführen, erfolglos. Diese Reaktion hätte man nach dem Verhalten der ω -Amino-thiosäuren erwartet, bei denen das Verhältnis von unpolaren reaktionsfähigen Molekülen zu stabilen Zwitterionen deutlich vergrößert ist⁴⁾.

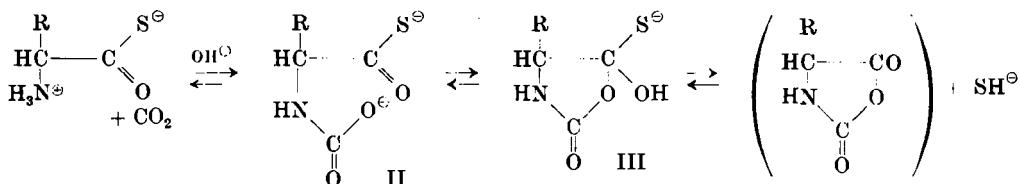
thiosäure, zwar ist auch bei $p\text{H} 1.9$ bei dieser Verbindung eine deutliche kathodische Wanderung bei der Papierelektrophorese zu beobachten, was ebenfalls auf einen größeren Anteil des Kations mit $\text{H}_3\text{N}^{\oplus}$ - und $-\text{COSH}$ schließen läßt, doch blieben die Versuche, durch Erhitzen eine Polykondensation oder nennenswerte Diketopiperazinbildung herbeizuführen, erfolglos. Diese Reaktion hätte man nach dem Verhalten der ω -Amino-thiosäuren erwartet, bei denen das Verhältnis von unpolaren reaktionsfähigen Molekülen zu stabilen Zwitterionen deutlich vergrößert ist⁴⁾.

Acylierende Wirkung der Aminothiosäuren

Die von Br. Pawleski⁸⁾ entdeckte acylierende Wirkung der Thioessigsäure hatte uns zu der Erwartung verleitet, daß auch die Aminothiosäuren als Acylierungskomponenten für Peptidsynthesen brauchbar sein könnten. Dies hat sich indessen nicht erfüllt, da die Gruppierung $R-C\begin{smallmatrix} O \\ \searrow \\ S^{\ominus} \end{smallmatrix}$ keine acylierende Wirkung hat. Man kann dies auch an der Thioessigsäure erkennen, die in alkalisch-wäßriger Lösung, auch in Gegenwart von NH_3 , kein Sulfid abspaltet (negative Reaktion mit Nitroprussidnatrium). Nach kurzem Erwärmen mit verdünnter Salzsäure läßt sich jedoch H_2S in reichlicher Menge nachweisen. Daraus folgt, daß nur die $-C\begin{smallmatrix} O \\ \searrow \\ SH \end{smallmatrix}$ -Gruppierung nucleophil, im

Fall der Hydrolyse durch das Wasser, angreifbar ist, vielleicht als $-C\begin{smallmatrix} O \\ \searrow \\ SH_2^{\oplus} \end{smallmatrix}$.

Unsere Aminothiosäuren geben ebenfalls in alkalischer Lösung mit Nitroprussid keine Farbreaktion. Der Schwefel läßt sich auch nicht durch Kochen mit NH_4OH abspalten. Setzt man aber der heißen, schwach ammoniakalischen Lösung HCO_3^{\ominus} zu, so kommt es zu einer raschen Abspaltung des mit Nitroprussid nachweisbaren SH^{\ominus} . Man begegnet hier einem weiteren Beispiel des in unserem Laboratorium aufgefundenen „Bicarbonateffektes“ bei der Spaltung von $S\text{-}\alpha\text{-Aminoacylverbindungen}$ ⁹⁾. Die starke Beschleunigung der Abspaltung des α -Aminoacylrestes wurde dort auf die intermediäre Bildung einer cyclischen reaktionsfähigen Verbindung vom Typ der „Leuchsschen Körper“ zurückgeführt. Bei den Aminothiosäuren kann diese Reaktion folgendermaßen formuliert werden:



Das cyclische Produkt III kann unter SH^{\ominus} -Abspaltung in das unbeständige Anhydrid übergehen. Die umgekehrte Reaktion läßt sich als Bildungsweise von Aminothiosäuren verwirklichen¹⁰⁾. Führt man die Spaltung durch HCO_3^{\ominus} in Gegenwart einer zweiten Aminosäure aus, so kann man papierchromatographisch die Bildung eines Dipeptids erkennen (s. Abbild. 2), eine Reaktion, die ohne HCO_3^{\ominus} nicht abläuft. Um dies zu erklären, kann man für den zunächst gebildeten Leuchsschen Körper vor seinem hydrolytischen

⁸⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **31**, 661 [1898].

⁹⁾ Th. Wieland, R. Lambert, H. U. Lang u. G. Schramm, Liebigs Ann. Chem. **597**, 181 [1955].

¹⁰⁾ K. E. Euler, Diplomarb. Universität Frankfurt a. M. 1955/56.

Zerfall eine Reaktion mit der zweiten Aminosäure zum Peptid annehmen. Aber auch eine nucleophile Substitution des Schwefels in III durch den Amino-stickstoff ist auf Grund von Beobachtungen nicht von der Hand zu weisen, über die an anderer Stelle berichtet ist⁹).

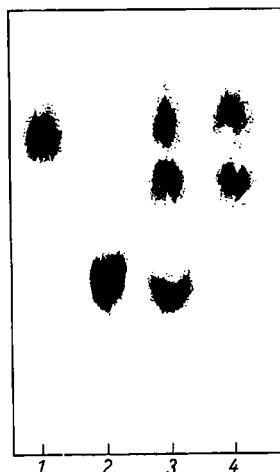


Abbildung. 2. Papierchromatogramm eines Peptidsynthese-Ansatzes mit Thioalanin und Glycin in Gegenwart von HCO_3^- . 1: Alanin, 2: Glycin, 3: Synthesemischung, 4: Authent. Gemisch von Alanin (oben) und Alanylglycin

Oxydationsprodukte von Aminothiosäuren

Aminothiosäuren sind leicht oxydierbar. Mit H_2O_2 entstehen hierbei neben Schwefel und Schwefelsäure die S-freien Aminosäuren, ohne daß Zwischenprodukte der Oxydation nachgewiesen werden können. Hingegen beobachtet man nach Einwirkung von Jod in neutraler Lösung bis zum 5 Min. langen Bestehenbleiben der Braunfärbung Schwefel - Bildung und im Papier-pherogramm ($p_{\text{H}} 1.9$) einige ninhydrin-positive Substanzen, die mit verschiedener Geschwindigkeit zur Kathode wandern (Abbildung. 3). In Nr. 1 dieser

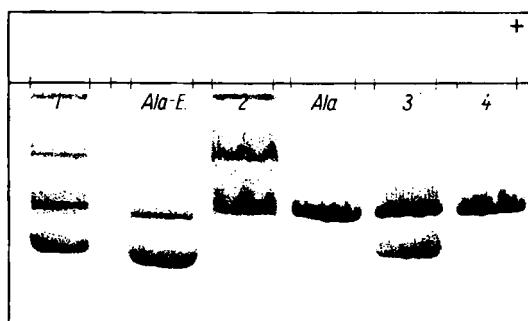
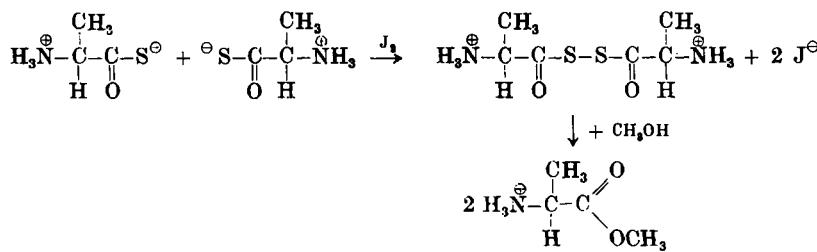


Abbildung. 3. Paperelektropherogramm der Jodoxydationsansätze von Thioalanin. 1: in Methanol, 2: in Tetrahydrofuran, 3 und 4: Nach Behandlung von 1 und 2 mit wäßriger AgNO_3 -Lösung. Zum Vergleich: Alanin-methylester (wenig Alanin) = Ala-E. und Alanin = Ala

Abbildung, dem Jodoxydationsansatz des Thioalanins in Methanol-Suspension, erkennt man vier Zonen, in Nr. 2, dem Ansatz mit Jod in Tetrahydrofuran, nur drei. Durch Vergleich mit Alanin und Alanin-methylester ließ sich die Natur der beiden am weitesten wandernden Produkte leicht erkennen. In Methanol bildet sich bei der Jodoxydation Alanin-methylester, daneben ist in beiden Ansätzen Alanin vorhanden. Von den verbleibenden ninhydrin-positiven Stoffen können wir den in beiden Ansätzen entstandenen basischen (mittlerer Streifen in Abbild. 3, Ansatz 2) in seiner Konstitution sichern. Alle Bemühungen, ihn in Substanz zu isolieren, scheitern an seiner großen Unbeständigkeit. $0.5n$ NaOH zersetzt ihn augenblicklich unter Alaninbildung, in 50-proz. Essigsäure ist er nach etwa 1 Stde. bei 20° ebenfalls zu Alanin gespalten. Mit Hydroxylamin bildet er Alanyl-hydroxamsäure. Wenn man versucht, die Substanz durch Reaktion mit 1-Fluor-2.4-dinitro-benzol in ein krist. Dinitrophenylderivat zu verwandeln, erhält man nur Kristalle von Bis-[2.4-dinitro-phenyl]-sulfid als Beweis für das Auftreten von H_2S bei der Alkalibehandlung des labilen Oxydationsproduktes. Da schließlich auch nach dem Zusatz von Ag^+ zu den Oxydationsansätzen die Bande dieses Stoffes verschwunden ist, kann man den nahe-liegenden Schluß ziehen, daß bei der Jodoxydation analog zur alten Beobachtung an der Thioessigsäure¹¹⁾ eine disulfidische Verdoppelung der Moleküle zum Dialanyldisulfid stattgefunden hat. Die sekundäre Reaktion dieser Verbindung mit Methanol zum Alanin-methylester kann auf die acylierende Eigenschaft des S-gebundenen Alanylrestes zurückgeführt werden.



Bildung von gemeinsamen Kristallisaten

Die höheren Aminothiosäuren kristallisieren aus Methanol/Wasser mit ihren S-freien Stammverbindungen zusammen in mikroskopisch einheitlichen Kristallen aus, was ihre Trennung durch Umkristallisieren unmöglich macht. In der II. Mitteil.⁴⁾ haben wir auf Grund der Identität der Debye-Scherrer-Diagramme von Thioisoleucin mit einem Kristallisat aus Thioisoleucin + Isoleucin das letztere als Mischkristall gedeutet. Da ein mechanisches Gemenge beider Komponenten ein Diagramm liefert, in dem ebenfalls die Linien der Aminothiosäure das Bild beherrschen und in dem die Interferenzen des Isoleucingitters nur in geringer Stärke hervortreten, scheint uns für eine genauere Untersuchung dieser Frage das Debyc-Scherrer-Diagramm nicht aufschlußreich genug. Wir haben deshalb durch die Freundlichkeit von Prof.

¹¹⁾ A. Kekulé u. E. Linnemann, Liebigs Ann. Chem. 123, 279 [1862].

Dr. P. Royen im Institut für Anorganische Chemie der hiesigen Universität durch Herrn Dr. H. Reinhardt*) einige röntgengoniometrische Analysen ausführen lassen. Es wurde hier eine Reihe von verschieden zusammengesetzten Kristallisaten untersucht, die sich aus der gemeinsamen wäßrigen Lösung beim Abkühlen ausscheiden. Ihre quantitative Zusammensetzung wurde durch S-Analyse ermittelt. Man erhält so z. B. aus Thiomethionin und Methionin bei Einwaagen von

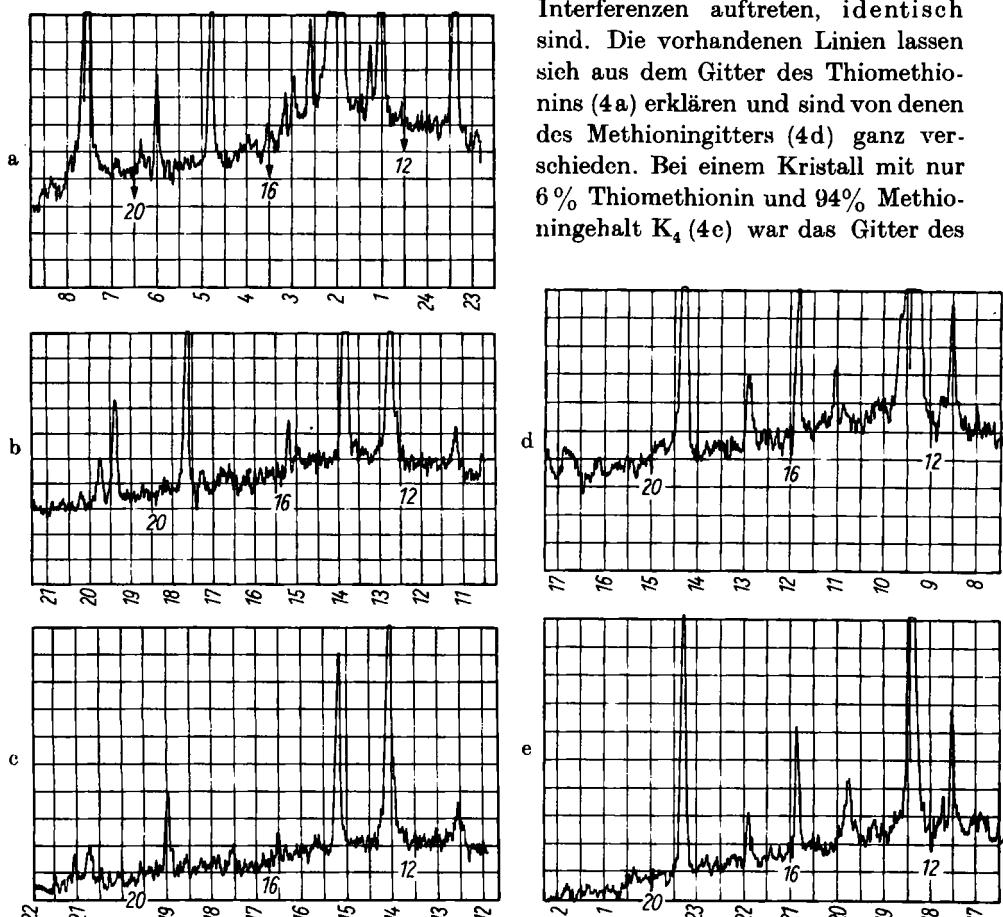
50:20 mg ein Kristallisat K_1 von 90% Thio- und 10% Aminosäure

50:35 mg „ „ K_2 „ 62% „ „ 38% „

50:50 mg „ „ K_3 „ 30% „ „ 70% „

Die goniometrischen Aufnahmen im Vergleich mit denen des reinen Thiomethionins und Methionins (Abbild. 4) erlauben die Aussage, daß die Gitter von K_1 , K_2 (4 b) und K_3 (4 c), zwischen denen keine unterschiedlichen

Interferenzen auftreten, identisch sind. Die vorhandenen Linien lassen sich aus dem Gitter des Thiomethionins (4 a) erklären und sind von denen des Methioningitters (4 d) ganz verschieden. Bei einem Kristall mit nur 6% Thiomethionin und 94% Methioningehalt K_4 (4 e) war das Gitter des



Abbild. 4. Röntgengoniometrische Aufnahmen von Methionin-Thiomethionin-Präparaten
a) Thiomethionin, b) K_2 (s. Text), c) K_3 (s. Text), d) Methionin, e) K_4 (s. Text)

*) Auch an dieser Stelle sei für diese wertvolle Hilfe herzlich gedankt.

Methionins das bestimmende. In dem vorliegenden Fall darf also mit ziemlicher Sicherheit von einer echten Mischkristallbildung gesprochen werden, bei der in weiten Konzentrationsgrenzen die Aminosäure mit der Aminothiosäure ein Gitter ausbildet, das in seiner Struktur anlage im wesentlichen dem der Thiosäure gleicht.

Nicht so eindeutig liegen die Verhältnisse beim Paar Thiovalin/Valin. Hier zeigen die goniometrischen Aufnahmen eines Kristallisates mit 80% Thioverbindung ebenfalls alle Interferenzen des Thiovalingitters und keine des Valingitters. Es tritt aber dabei mindestens noch eine neue Linie auf, die keiner der beiden reinen Substanzen zuzuordnen ist. Ihre Intensität ist noch stärker in einem analogen Gemisch der Zusammensetzung 40:60. Man kann hieraus nicht entscheiden, ob zwei Kristallarten, Thiovalin und ein Mischkristall aus Thiovalin + Valin, vorliegen oder ob ein neues wenig verschiedenes Gitter gebildet wurde, in dem die beiden Bausteine Platz finden. Die Debye-Scherrer-Diagramme zeigen bei der sehr großen Ähnlichkeit der Gitter Identität der gemischten Kristallisate mit dem Thiovalin (Abbildung 5).

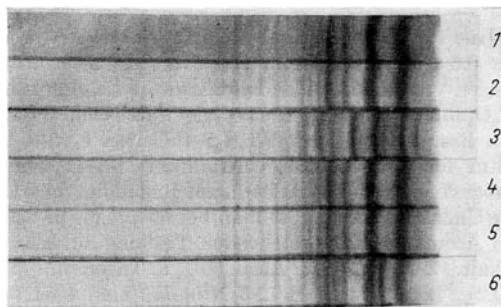


Abbildung 5. Debye-Scherrer-Diagramme einiger gemischter Kristallisate des Thiovalins (1) mit Isoleucin + Alanin + Methionin (2), mit Isoleucin (4), mit Alanin (5). 3 = reines Isoleucin, 6 = mechanisches Gemenge von Thiovalin und Alanin

Solche Kristallisate mit dem Typ des Thiovalingitters erhält man auch aus 50 mg Thiovalin mit 10 mg Alanin oder 10 mg Isoleucin oder 10 mg Isoleucin + 10 mg Alanin + 10 mg Methionin. In diesen Gemischen sind die Komponenten im Papierphero gramm in etwa dem erwarteten Verhältnis nachzuweisen.

Schließlich interessierte uns noch an einem Beispiel zu erfahren, ob bei der gemeinsamen Kristallisation einer Aminothiosäure mit ihrer Stammsubstanz und einer dritten, fremden Aminosäure eine Anreicherung der verwandten Komponente stattfindet. Zu diesem Zweck ließ man die heiß gesättigte Methanol/Wasserlösung von 100 mg Thiovalin, 80 mg Valin und 80 mg Alanin kristallisieren und erhielt dabei einheitliche Kristalle, in denen neben 90% Thiovalin etwa 8% Valin und nur 2% Alanin enthalten waren, wie die Retentionsanalyse zeigte. Nicht ohne Interesse wären in diesem Zusammenhang Versuche zur optischen Spezifität bei Kristallisationen mit D- und L-Aminosäuren.

Dem Fonds der Chemie danken wir herzlich für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit, Hrn. Röhm, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, für die Anfertigung der Debye-Scherrer-Diagramme.

Beschreibung der Versuche

Standardmethode zur Darstellung von α -Aminothiosäuren: Man löst das Aminoacyl-thiophenol-hydrochlorid in der eben ausreichenden Menge von trockenem Methanol, gibt bei 0° unter starkem Umrühren ein Äquivalent Triäthylamin zu und fällt das Amin-hydrochlorid durch Zugabe der 10fachen Menge von absol. Äther. Nach kurzer Zeit wird rasch abfiltriert und in das Filtrat bei 0° 30 Min. H₂S eingeleitet. Dann setzt man ein weiteres Äquivalent Triäthylamin zu, lässt unter Einleiten von H₂S auf Zimmertemperatur kommen und lässt noch weitere 2–3 Stdn. H₂S durch die Lösung perlen. Nun wird das Reaktionsgefäß verschlossen und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit kaltem Methanol und Äther gewaschen. Er beträgt 70–80% der theoretisch zu erwartenden Menge. Die niederen Aminothiosäuren, des Glycins und Alanins, kristallisiert man durch vorsichtiges Zutropfen von Wasser zur siedenden methanol. Aufschämmung bis zur Lösung und Abkühlen um. Die höheren (Thio-valin, -methionin, -isoleucin) lassen sich aus einer großen Menge siedenden Methanols ohne Wasserzusatz umkristallisieren. Die so erhaltenen Produkte sind analysenrein.

Glycyl-thiovalin: 1 g Glycyl-valyl-thiophenol·HCl¹²) werden in 5 ccm absol. Methanol bei 0° mit 0.5 ccm Triäthylamin und dann mit 50 ccm absol. Äther versetzt. Nach raschem Absaugen vom Niederschlag leitet man in die eisgekühlte Lösung H₂S ein, der über CaCl₂ und P₂O₅ in Trockentürmen getrocknet war. Nach 1/2 Stde. setzt man weitere 0.5 ccm der tertiären Base zu und setzt das H₂S-Einleiten 1 Stde. bei 0°, dann 2 Stdn. bei Zimmertemperatur fort. Über Nacht kristallisiert im Eisschrank das rohe Thiodipeptid aus, das abgesaugt, mit absol. Methanol und dann mit trockenem Äther gewaschen wird. Zum Umkristallisieren löst man bei 50° in möglichst wenig Wasser, gibt nach dem Abkühlen Aceton bis zur bestehenden Trübung zu, klärt durch gelindes Erwärmen und stellt kalt. Zers.-P. 240°; Ausb. 50% d. Theorie.

C₇H₁₄O₂N₂S (190.2) Ber. C 44.21 H 7.36 N 14.74 Gef. C 44.73 H 7.92 N 14.78

Im Papierelektropherogramm ist nur ein Produkt wahrzunehmen, das erst bei p_H 1.9 langsam zur Kathode wandert und mit Ninhydrin eine gelbe, später nachdunkelnde Farbreaktion gibt. Bei der Hydrolyse mit HCl entsteht Glycin und Valin neben H₂S.

Glycyl-thiovalin verändert sich auch beim 24stdg. Erhitzen im geschlossenen Rohr auf 100° nicht. Die Substanz bleibt dabei wasserlöslich und verändert ihr papierchromatographisches Verhalten nicht.

Glycyl-valyl-thioisoleucin: 500 mg Glycyl-valyl-isoleucyl-thiophenol·HCl¹²) werden in 30 ccm absol. Methanol gelöst und mit H₂S gesättigt. Dann gibt man 0.15 ccm Triäthylamin zu und setzt das Einleiten einige Stunden lang fort. Nach mehrstündigem Aufbewahren der H₂S-gesättigten Lösung im Eisschrank fällt man vorsichtig fraktioniert mit kleineren Portionen von absol. Äther und kristallisiert die ersten thiodipeptid-haltigen Fraktionen nach wiederholtem Waschen mit Methanol aus Aceton/Wasser um. Ein mit kleiner Ausbeute erhaltenes Produkt war im Pherogramm einheitlich.

C₁₃H₂₆O₂N₂S (303.2) Ber. N 13.85 Gef. N 13.56

Im Hydrolysat treten Glycin, Valin und Isoleucin mit gleicher Intensität auf.

Darstellung von *N*-Carbobenzoxy-thioglycin

1. Nach der Thiophenylester-Methode: 0.25 g Cbo-Glycyl-thiophenol¹³) werden in 20 ccm Äther und 0.14 ccm Triäthylamin während mehrerer Stunden durch

¹²) Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 582, 218 [1953].

¹³) Th. Wieland, W. Schäfer u. E. Bokelmann, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 [1951].

Einleiten von H_2S bei 20° umgesetzt. Anschließend wird mit Wasser unterschichtet, geschüttelt und der wäßrige Auszug eben mineralsauer gemacht. Das ausgeschiedene Öl wird in wenig Äther aufgenommen, mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Zugabe von Petroläther erhält man Kristalle vom Schmp. $93\text{--}95^\circ$. Ausb. 60% d. Theorie.

$C_{10}H_{11}O_3NS$ (225.1) Ber. C 53.34 H 4.89 N 6.22 Gef. C 53.98 H 5.14 N 6.32

2. Nach der Anhydridmethode: 1.95 g Cbo-Glycin in 30 ccm Tetrahydrofuran und 1.4 ccm Triäthylamin werden bei -15° mit 0.95 ccm Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Nach 20 Min. saugt man rasch vom Niederschlag (Triäthylamin-HCl) ab, gibt nochmals 1.4 ccm Triäthylamin zu und leitet H_2S ein, wobei sich der Ansatz innerhalb von 3-4 Stdn. auf Zimmertemperatur erwärmt. Nach dem Abdampfen i. Vak. verfährt man wie oben und erhält 45% desselben Produkts vom gleichen Schmelzpunkt.

Bariumsalz des Benzalthioglycins und Umsetzung mit Alanin: Analog einer Vorschrift von M. Bergmann und Mitarb.⁶⁾ wurden 0.25 g Thioglycin und 0.52 g carbonat-freies $Ba(OH)_2$ in der eben erforderlichen Menge heißem Wasser gelöst und nach dem Abkühlen mit 0.35 ccm frisch dest. Benzaldehyd versetzt. Der rasch auskristallisierende Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig Eiswasser gewaschen und in konz. wäßr. Lösung sofort mit 200 mg Alanin versetzt. Eine nach 24 Stdn. entnommene Probe wies nach dem Ansäuern die Bildung von ca. 20% Glycyl-alanin aus (Papierchromatogramm).

Mit Benzaldehyd bildet sich in Isopropylalkohol bei Zugabe von K-Isopropylat aus Thioglycin ebenfalls das Salz der Benzalverbindung, das mit Alaninkalium bei 50° einen etwas besseren Umsatz zum Dipeptid gibt.

Peptidsynthese bei Anwesenheit von Hydrogencarbonat: 20 mg Thioglycin und 20 mg Glycin wurden in einer gesättigten wäßr. Lösung von $NaHCO_3$, 3 Stdn. auf 50° erwärmt. Davon unterwarf man einen Teil zur Entsalzung der Elektrophorese auf Filterpapier bei saurem p_H . Die zur Kathode gewanderte, ninhydrin-positive Verbindung trennte man nach der Elution durch Papierchromatographie in einem Gemisch aus sek.-Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:10:15) (s. Abbild. 2) und eluierte dann die gleich weit wie authent. Alanyl-glycin gewanderte ninhydrin-positive Zone in üblicher Weise. Nach 12stdg. Hydrolysern mit 5n HCl waren in diesem Eluat allein die Spaltstücke Alanin und Glycin elektrophoretisch nachzuweisen.

Stellt man denselben Versuch nur mit verd. $NaOH$ und in Abwesenheit von HCO_3^- -Ionen an, so läßt sich keine Spur des Dipeptids entdecken.

Oxydation von Thioalanin mit Jod: Die Oxydationen wurden entweder in Tetrahydrofuran-Aufschämmung oder in Methanol-Aufschämmung mit entsprechender Jodlösung durchgeführt. Ein definiertes Endprodukt konnte in keinem Fall erhalten werden, sondern nach anfänglich raschem Jodverbrauch von etwa 1 Atom pro Mol. Thiosäure zog sich die Entfärbung über längere Zeit, immer langsamer werdend, bis zu einem Verbrauch des Mehrfachen hin. Man kann nach der ersten raschen Jodaufnahme die Oxydation abbrechen. Es wurde versucht, auf verschiedenen Wegen die in Abbild. 3 sichtbaren unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen zu isolieren. Sie erwiesen sich jedoch als so labil, daß dieses Vorhaben nicht gelang. U. a. wurde versucht, durch Umsetzen mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol ein krist. DNP-Derivat zu erhalten. Wir isolierten Bis-[2,4-dinitro-phenyl]-sulfid vom Schmp. $197\text{--}198^\circ$ (Lit. 195°) und dem exakten C,H,N- und S-Gehalt.

Nach Zusatz von wäßriger $AgNO_3$ -Lösung war in den Oxydationslösungen nur noch Alanin oder Alanin + Alaninester (beim Arbeiten in Alkohol) nachweisbar.