

292. Inge von Brunn-Leube und Gerhard Schramm: Kondensation von Peptidmethylestern verschiedener Kettenlänge

[Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen]

(Eingegangen am 16. Mai 1956)

Aus Alanin und Glycin aufgebaute Peptidmethylester mit 3 bis 8 Kettengliedern wurden hergestellt und durch Erhitzen unter bestimmten Bedingungen kondensiert. Es entstanden definierte Peptidmethylester mit bis zu 25 Aminosäureresten. Die Kondensationsprodukte wurden in die Dinitrophenyl-Derivate übergeführt, papierchromatographisch getrennt und durch Infrarotspektroskopie identifiziert.

Für Strukturuntersuchungen auf dem Gebiet der Proteinchemie wäre es wünschenswert, höhermolekulare Peptide definierter Zusammensetzung und Kettenlänge als Modellsubstanzen zur Verfügung zu haben. Zur Darstellung solcher Peptide hat sich die zuerst von E. Fischer angewandte Kondensation von Methylestern der Tri- und höheren Peptide als geeignet erwiesen. Von G. Schramm und H. Restle¹⁾ waren die bei der Kondensation von Alanyl-glycylglycin-methylester auftretenden Reaktionsprodukte papierchromatographisch getrennt und ihre Struktur aufgeklärt worden. Bei kurzzeitigem Erwärmen wurden alle zu erwartenden Zwischenstufen, bis zum 21-Peptid, aufgefunden. Unter energischen Bedingungen trat hingegen eine Zersetzung auf, die die Trennung der Reaktionsprodukte erschwerte. Die Zersetzung beruhte im wesentlichen auf der Bildung von Diketopiperazinen, die vom Carboxylende her erfolgte²⁾.

Es war nun zu erwarten, daß die chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte umso besser gelingt, je größer man die Gliederzahl des Ausgangsproduktes wählt. Es war weiterhin möglich, daß man hier zu besseren Ausbeuten an höhermolekularen Kondensationsprodukten gelangt, da die Zahl der Kondensationsschritte kleiner wird. Andererseits war aus den vorhergehenden Untersuchungen bekannt, daß die Kondensationsgeschwindigkeit mit der Molekülgröße abnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine lückenlose Reihe von Peptidmethylestern mit 3–8 Kettengliedern hergestellt und geprüft, bei welchem Ausgangsmaterial die besten Ergebnisse zu erzielen sind.

Es kam uns vor allem darauf an, unter möglichst geringer Zersetzung möglichst hochkondensierte Produkte zu erhalten. Bei diesen Untersuchungen stießen wir auf die merkwürdige Erscheinung, daß höhermolekulare Peptide bevorzugt in der Mitte zerbrechen. Es gelang noch nicht, die Ursachen hierfür aufzufinden.

1. Darstellung der Ausgangsstoffe

Vor Beginn der Kondensation waren umfangreiche präparative Vorarbeiten durchzuführen, um die besten Wege zur Herstellung der Ausgangsmaterialien und der zur Identifizierung benötigten Vergleichssubstanzen aufzufinden.

¹⁾ Makromolekulare Chem. **13**, 103 [1954].

²⁾ G. Schramm u. I. Leube, Makromolekulare Chem. **13**, 117 [1954].

Wir wählten für unsere Untersuchungen die am leichtesten zugänglichen Aminosäuren: Glykokoll und Alanin. Um für Naturstoffe brauchbare Modellsubstanzen zu erhalten, wird es notwendig sein, diese Versuche mit optisch aktiven Aminosäuren zu wiederholen. Da die Löslichkeit bei Peptiden, die aus verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt sind, besser ist als bei solchen, die nur aus einer Art bestehen, wählten wir als Ausgangspunkt für die Kondensationsversuche eine Reihe, bei der jeweils ein Alanyl- auf zwei Glycyl-Reste folgte (s. Tafel 1).

Tafel 1. Herstellung der Peptidmethylester

Gliederzahl der Komponenten Synthese nach		Endprodukt	Ausbeute in % bezogen auf Cbzo- Verbindung
Wieland	Goldschmidt		
	1 + 2 = 3	GGA-M	74
	1 + 3 = 4	GGAG-M	42
3 + 2 = 5		GGAGG-M	68
3 + 3 = 6		GGAGGA-M	25
5 + 2 = 7		GGAGGAG-M	36
5 + 3 = 8		GGAGGAGG-M	24

G = Glycyl-Rest, A = Alanyl-Rest, M = Methylester

Zur Darstellung der freien Peptide eignete sich die von Th. Wieland³⁾ angegebene Methode am besten, wobei wir von den gemischten Säureanhydriden der entsprechenden Carbobenzoxy(Cbzo)-Verbindungen, gelöst in Dioxan, Aceton, Tetrahydrofuran oder Diäthylformamid, ausgingen und die Amino-Komponente in alkalischer Lösung zufügten. Die nach diesem Verfahren ausgeführten Synthesen sind in Tafel 1 schematisch zusammengestellt. Die Ausgangskomponenten müssen so gewählt werden, daß sich das Endprodukt in seiner Löslichkeit gut von der eingesetzten Cbzo-Verbindung unterscheidet. Dies erreicht man am besten dadurch, daß man die Gliederzahl der Amino-Komponente möglichst groß wählt und als Amino-Komponente Di- oder Tripeptide verwendet. Zur Anhydrid-Herstellung bewährten sich, wie Wieland angibt, besonders die höheren Ester der Chlorameisensäure; wir arbeiteten hauptsächlich mit dem Benzyl- und dem Octylester. Die Ausbeuten an analysenreinen Endprodukten lagen zwischen 24 und 68%.

Zur Herstellung der Peptidester behandelten wir die Cbzo-Peptide mit Diazomethan und spalteten anschließend meist nach dem Verfahren von Anderson⁴⁾ den Cbzo-Rest mit Bromwasserstoff in Eisessig wieder ab. Die Estergruppe wurde dabei zum geringen Teil verseift, und es war daher zweckmäßig, das Reaktionsgemisch noch einmal in methanolischem Bromwasserstoff zu lösen, um die entstandenen freien Peptide wieder zu verestern. Bei der umgekehrten Reihenfolge, d. h. wenn man zuerst den Cbzo-Rest abspaltet und dann verestert, erhält man schlechtere Ausbeuten, da bei diesem Verfah-

³⁾ Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 [1951].

⁴⁾ G. W. Anderson, J. Blodinger, R. W. Young u. A. D. Welcher, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5304 [1952].

ren leichter eine Zersetzung der Peptidester eintritt. Die Hydrobromide der höheren Ester mit einer Gliederzahl von 4–8 sind schwer in fester Form zu erhalten. Am besten gelang uns dies bei Kühlung auf -70° . Wir konnten jedoch alle benötigten Verbindungen in reiner kristalliner Form fassen; die Reinheit wurde außerdem in jedem Fall chromatographisch nachgeprüft.

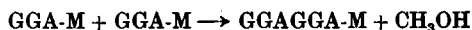
Aus den Hydrobromiden wurden die Ester durch Zugabe der berechneten Menge Natriummethylat bei 0° in Freiheit gesetzt. Die freien Ester wurden jedoch nicht isoliert, sondern nach dem Abdampfen des Methanols der Kondensation unterworfen.

Zur Herstellung der niederen Ester bewährte sich das von St. Goldschmidt und H. Lautenschlager⁵⁾ angegebene Phosphorazo-Verfahren sehr gut (vergl. Tafel 1). Bei diesem wird bekanntlich die Aktivierung der Ausgangskomponenten mit Phosphortrichlorid vorgenommen. Entscheidend für den Erfolg des Verfahrens ist die sorgfältige Reinigung des benötigten Phosphortrichlorids und des Pyridins. Die Anwendbarkeit war begrenzt durch die Löslichkeit der Peptidester in Pyridin.

Zu Vergleichszwecken benötigten wir weiterhin eine Reihe von Dinitrophenyl(DNP)-Derivaten der Peptide und Peptidester. Diese wurden nach F. Sanger⁶⁾ mit Dinitrofluorbenzol in alkalischer Lösung hergestellt. Um die Hydrolyse der Ester zu vermeiden, wurde bei der Darstellung nur die dem Dinitrofluorbenzol äquivalente Menge an $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zugesetzt (1 Mol. Peptidester + 3 Moll. Dinitrofluorbenzol + $\frac{2}{3}$ Moll. $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Bei der Reinheitsprüfung der DNP-Derivate sowie der verschiedenen Cbz-Verbindungen bewährte sich die früher ausgearbeitete quantitative Ultraviolett-spektroskopie der absorbierenden Reste⁷⁾.

2. Durchführung der Kondensation

Die Kondensation der Ester erfolgte unter Abspaltung von Methanol nach folgender Gleichung:



Um das gebildete Methanol schnell abzuführen, wurde die Kondensation im Vakuum bei etwa 10^{-2} Torr durchgeführt. Da die Anwendung von Lösungsmitteln nach früheren Erfahrungen die Zersetzung zu Diketopiperazinen fördert, wurden die Ester als solche benützt. Sie wurden als durchsichtige, glasige Produkte eingesetzt; am Ende der Reaktion lag eine schwach gelb gefärbte, feste Masse vor. Die Analyse der entstandenen Produkte erfolgte am besten nach der Methodik von Schramm und Restle¹⁾. Nach dieser setzt man das Reaktionsprodukt mit Dinitrofluorbenzol um, trennt die Peptide chromatographisch und bestimmt durch Infrarotmessung nach U. Schiedt und H. Restle⁸⁾ ihre Kettenlänge. Wenn diese bekannt ist, kann die Ausbeute an den einzelnen Dinitrophenyl(DNP)-Peptiden durch ultraviolett-spektroskopische Messung⁷⁾ bestimmt werden.

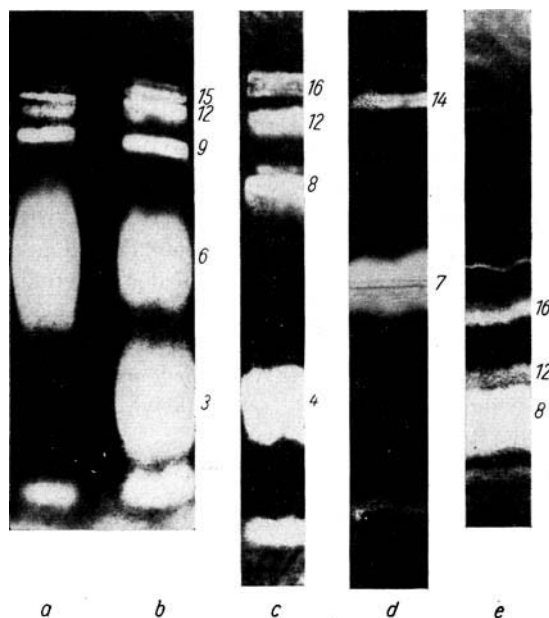
⁵⁾ Liebigs Ann. Chem. 580, 68 [1953]. ⁶⁾ Biochem. J. 39, 507 [1945].

⁷⁾ I. Leube, H. Restle u. M. Wiedemann, Z. Naturforsch. 9b, 186 [1954].

⁸⁾ Z. Naturforsch. 9b, 182 [1954].

Um die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den einzelnen Ausgangspeptiden untereinander vergleichen zu können, wurden sämtliche Kondensationen bei 110° 90 Min. lang durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen hatten sich bei den Vorversuchen als besonders günstig erwiesen. In einzelnen Fällen wurde dann noch der Einfluß längerer Reaktionszeiten und höherer Temperaturen geprüft.

Einige charakteristische Chromatogramme, die bei der 90-Min.-Kondensation erhalten wurden, sind in Abbild. a–e wiedergegeben. Neben den DNP-Produkten traten auch noch Nebenbanden auf. So finden wir z. B. bei der Kondensation des Tripeptids in Abbild. b als schnellste Bande unverseiften



Ultraviolett-Kontaktabzüge der Chromatogramme der Kondensationsprodukte von a) GGAGGA-M; b) GGA-M; c) GGAG-M; d) GGAGGAG-M; e) GGAGGAGG-M Kondensationsbedingungen: 90 Min. bei 110° . Die chromatographische Trennung erfolgte in: a) bis d) Butanol-Essigsäure und e) Butanol-Pyridin-Wasser

Ester des Tripeptids, dann folgt Dinitrophenol, das aus dem Dinitrofluorbenzol stammt. Danach kommen die Banden des DNP-Tripeptids, -Hexapeptids usw. An der Startlinie läßt sich mit der Ninhydrin-Reaktion meist etwas freies Peptid nachweisen. Diketopiperazine traten bei diesen kurzen Reaktionszeiten nicht auf, ebensowenig ergaben sich Anhaltspunkte für das Vorkommen von *N*-Methylderivaten, die sich nach L. A. Æ. Sluyterman und H. J. Veenendaal⁹⁾ bei längerem Erwärmen von Peptidmethylestern bilden können.

⁹⁾ Recueil Trav. chim. Pays-Bas 71, 137 [1952].

Die quantitativen Ergebnisse der Kondensation zeigt Tafel 2. Aus ihr läßt sich der erreichte Polymerisationsgrad und die Ausbeute an den einzelnen Peptiden ersehen, weiterhin ist in ihr die Gliederzahl, d. h. die Zahl der Aminosäurereste, angegeben, wie sie sich nach der Identifizierung der R_F -Werte mit Vergleichssubstanzen und der Reihenfolge der Banden berechnen läßt und wie sie mit der Infrarotmethode tatsächlich gefunden wurde.

Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit kann am besten die Menge des verbliebenen Ausgangsmaterials dienen. Danach ergibt sich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit beim Tripeptid am größten ist, doch auch beim Tetra- und Pentapeptid ist der Umsatz noch befriedigend. Deutlich schlechter sind die Umsätze beim 6-, 7- und 8-Peptid. Betrachtet man die Kettengliederzahlen, die erreicht werden, so ergibt sich der höchste Wert bei der Kondensation des Pentapeptids mit 25 Aminosäureresten. Da bei diesem auch die Reaktionsgeschwindigkeit noch einigermaßen befriedigend ist, würden wohl als Ausgangsmaterial für die Darstellung möglichst hochmolekularer Peptide die Pentapeptidester am günstigsten sein. Wegen der relativ großen Unterschiede in den R_F -Werten der verschiedenen Polymerisationsstufen und der Abwesenheit störender Zwischenprodukte wäre hier auch die Rcindarstellung der einzelnen Kondensationsstufen gut durchzuführen.

Wie bereits von Schramm und Restle¹⁾ bei der Kondensation des Tripeptidesters gezeigt wurde, lassen sich durch Verlängerung der Reaktionszeiten die Ausbeuten an höheren Peptiden noch steigern. In Tafel 3 sind die Ausbeuten bei der Kondensation des GGAG-M nach 24 Std. und nach 90 Min. miteinander verglichen. Die Menge des Ausgangsmaterials hat nach

Tafel 2. Ergebnisse der Kondensation verschiedener Peptidmethylester
90 Minuten bei 110°

P	3-Peptid			4-Peptid			5-Peptid			6-Peptid			7-Peptid			8-Peptid		
	b.	n	%	b.	n	%	b.	n	%	b.	n	%	b.	n	%	b.	n	%
1	3		50	4	4.3	72	5	5.4	69	6		85	7	7.8	83	8	8.6	86
1.5										9	9.5	8				12	11.8	3
2	6		28	8	8.7	21	10	10.3	21	12	12.5	5.8	14	14.5	5.8	16	15.8	6.8
3	9	8.5	13	12	11.7	5.3	15	14.8	5				21		2.0			
4	12	12.2	5	16		1.1	20	16.5	1.2									
5	15	14.7	2.7				25	25.1	0.3									
6	18	16	0.4															

P = Polymerisationsgrad, n = Kettengliederzahl, b. = berechnet, g. = gefunden, % = Ausbeute in %.

24 Std. deutlich abgenommen, und die Konzentration an höheren Kondensationsprodukten ist entsprechend gestiegen, wobei allerdings nur ein um eine Einheit höherer Polymerisationsgrad erreicht wurde. Bei einem Versuch mit dem Pentapeptidester GGAGG-M waren nach 96stdg. Kondensation bei 110° deutlich Diketopiperazine nachweisbar, ohne daß ein höheres Kondensationsprodukt als das auch unter milden Bedingungen gefaßte Peptid mit 25 Aminosäureresten aufgetreten wäre.

Bei den höheren Peptiden, und zwar beim 6- wie beim 8-Peptid, ergab sich als interessante Anomalie ein Kondensationsprodukt mit dem Polymerisations-

grad 1.5. Im Chromatogramm des Hexapeptids (Abbild. a) trat die Bande des 9-Peptids besonders deutlich auf, was bei einem normalen Verlauf der Kondensation nicht möglich wäre. Der als Ausgangsmaterial benützte Peptidester erwies sich bei der chromatographischen Prüfung als vollständig frei von Tripeptid. Die Identifizierung des entstandenen 9-Peptids war einwandfrei, da auf dem gleichen Papierbogen zur Kontrolle die Kondensationsprodukte des 3-Peptids aufgetragen waren. Außerdem ergab die Infrarotmessung eindeutig 9 Aminosäuren. Es muß also hier ein Molekül des Hexapeptids in der Mitte zerbrochen sein und 3 Aminosäurereste auf ein anderes Hexapeptid übertragen haben. Es könnte sich auch um eine Transpeptidierung handeln. Der verbleibende Stumpf muß ebenfalls mit einem Hexapeptid weiter reagieren, denn wir konnten Tripeptid höchstens in Spuren nachweisen.

Ähnliche Verhältnisse fanden wir beim 8-Peptid. Hier trat als anomales Kondensationsprodukt die Bande des 12-Peptids auf (Abbild. e). Auch hier wurde die Identifizierung durch eine viermal wiederholte Infrarotmessung gesichert. Die Menge des 12-Peptids war recht erheblich, sie betrug etwa die Hälfte des normalen Kondensationsproduktes mit 16 Gliedern. Also muß auch hier das Peptidmolekül in der Mitte auseinander gebrochen sein. Auffallend ist, daß wir bei der Kondensation des 4-, 5- und 7-Peptids den Polymerisationsgrad 1.5 nicht fanden, obwohl wir sorgfältig nach anomalen Kondensationsprodukten gesucht haben.

Tafel 3. Vergleich der Kondensation des Tetrapeptidmethyl-esters GGAG-M nach 90 Min. und nach 24 Stdn. bei 110°

Gliederzahl	Ausbeute in %	
	nach 90 Min.	nach 24 Stdn.
4	72	58
8	21	26
12	5.3	11
16	1.1	2.6
20	—	1.1

Auf Abbild. c ist z. B. der Raum zwischen 4- und 8-Peptid vollständig frei von dem zu erwartenden 6-Peptid, ebenso finden wir auf Chromatogramm d keine Spuren von Kondensationsprodukten mit einer Gliederzahl zwischen 7 und 14. Es ist allerdings zu bemerken, daß wir bei anderen Versuchen mit dem 7-Peptid spurenweise Zwischenbanden gefunden haben, die nach den R_f -Werten einem 10- oder 14-Peptid entsprachen. Eine eindeutige Identifizierung war aber hier im Gegensatz zum 6- und 8-Peptid nicht möglich.

Die Labilität der mittleren Peptidbindungen beim 6- und 8-Peptid wird nicht durch die Art der daran beteiligten Aminosäurereste bedingt, denn beim Hexapeptid handelt es sich um die Bindung Ala-Gly, beim Oktapeptid dagegen um Gly-Gly. Zum Vergleich wurde auch der Ester des Hexapeptids Ala-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly der Kondensation unterworfen, wobei ebenfalls das 9-Peptid in erheblicher Menge auftrat; hier besteht die labile Bindung zwischen Gly-Ala.

Vorläufig nehmen wir an, daß aus bisher unbekanntem Gründen bei höheren Peptiden die mittleren Peptidbindungen labil sind, und zwar scheint diese Labilität bei den geradzahligen Peptiden besonders ausgeprägt zu sein. Es sind Versuche im Gange, diese Hypothese an weiteren Beispielen zu prüfen.

Für die Durchführung der Infrarotmessungen danken wir Fr. I. Köhler und Herrn Dr. E. Biekert. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

A. Darstellung der Ausgangsprodukte

1. Derivate des 3-Peptids

Cbzo-GGA nach Wieland³⁾: 21.6 g Cbzo-GG wurden in 100 ccm getrocknetem Aceton und 23.2 ccm Tributylamin gelöst und auf -15° abgekühlt. Unter Rühren mit einem KPG-Rührer wurden 19 g Chlorameisensäure-benzylester zugefügt (letzterer und Tributylamin in 10-proz. Überschuß). Nach 50 Min. Rühren in der Kälte wurden 14.4 g Alanin in 160 ccm 1*n* NaOH (beides 50-proz. Überschuß) zugegeben. Es trat starke Kohlensäure-Entwicklung ein. Daraufhin wurde 2 Stdn. in der Kälte und anschließend 2 Stdn. bei Zimmertemperatur weiter gerührt. Da die Lösung noch trüb war, wurden nochmals 60 ccm 1*n* NaOH zugegeben. Das p_{H} betrug 7–8. Das Aceton wurde i. Vak. abgezogen und die Lösung dreimal ausgeäthert. Daraufhin wurde die Lösung i. Vak. eingeengt und auf p_{H} 3 angesäuert. Das Cbzo-GGA fiel sofort kristallin aus. Nach 12stdg. Stehenlassen im Eisschrank wurde der Niederschlag abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und je einmal aus Wasser und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 57% d. Th.; Schmp. 184° .

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3$ (337.3) Ber. N 12.5 Cbzo 40 Gef. N 12.5 Cbzo 39

Der Gehalt an Carbobenzoxy(Cbzo)-Rest wurde ultraviolett-spektroskopisch bestimmt, wobei eine Molextinktion von 212 bei 258 μ zugrundegelegt wurde⁷⁾.

Bei Verwendung von Diäthylformamid als Lösungsmittel und einer Reaktionszeit zur Anhydridbildung von 65 Min. wurde das symmetrische Anhydrid (Cbzo-Gly-Gly-CO)₂O erhalten, Schmp. 158° . Dessen Entstehung läßt sich durch Herabsetzen der Reaktionszeit auf 5 Min. vermeiden.

$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{N}_4$ (514.5) Ber. C 56.0 H 5.1 N 10.9 Cbzo 52
Gef. C 55.8 H 5.3 N 10.9 Cbzo 52

GGA: Die Abspaltung des Carbobenzoxy-Rests aus dem Peptid wurde durch Hydrogenolyse mit Palladium-Mohr in Methanol-Eisessig vorgenommen. Ausb. 93% d. Th.; Schmp. 216–217 $^{\circ}$.

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_3$ (203.2) Ber. N 20.7 Gef. N 20.7

Da die Hydrogenolyse gegen Spuren von Kontaktgiften äußerst empfindlich ist, verwendeten wir daneben auch die Spaltung mit Phosphoniumjodid in 80-proz. Essigsäure nach C. R. Harrington und T. H. Mead¹⁰⁾.

Cbzo-GGA-M nach Goldschmidt³⁾

5.6 g (0.04 Mol) Alanin-methylester-hydrochlorid wurden in 70 ccm absol. Pyridin (über KOH frisch destilliert) in der Hitze gelöst, auf 0° gekühlt und unter Rühren mit einem KPG-Rührer mit 1.8 ccm (0.02 Mol) Phosphortrichlorid (über Dimethylanilin frisch destilliert) in 20 ccm Pyridin versetzt. Dann wurde $\frac{1}{2}$ Stde. bei Zimmertemperatur gerührt. Die trübe Lösung klärte sich nach Zugabe von 10.6 g Cbzo-GG (0.04 Mol), gelöst in 30 ccm Pyridin. Es wurde dann 3 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, dabei färbte sich die Lösung gelb-braun. Das Pyridin wurde i. Vak. abdestilliert, der sirupöse Rückstand in wenig Wasser und viel Essigester aufgenommen und 10mal mit je 100 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde gewaschen mit Wasser, verd. Salzsäure, Wasser, 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung und wiederum Wasser. Der Essigesterextrakt wurde mit Natriumsulfat getrocknet und mit Tierkohle entfärbt. Nach dem Absaugen und Waschen mit Essigester wurde das Filtrat eingeengt und mit Petroläther der Ester ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, in absol. Methanol gelöst und mit absol. Äther ausgefällt. Der Ester fiel kristallin aus. Ausb. 74.5% d. Th.; Schmp. 97° .

$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{N}_3$ (351.3) Ber. N 12.0 Gef. N 12.8

GGA-M-HBr nach Anderson⁴⁾: Die Abspaltung des Carbobenzoxy-Rests erfolgte mit 1*n* HBr in Eisessig bei 50° ⁴⁾. 5.3 g (0.015 Mol) Cbzo-GGA-M, in 45 ccm 1*n* HBr

¹⁰⁾ Biochem. J. 29, 1604 [1935].

in Eisessig gelöst, wurden 25 Min. unter Schütteln auf 50° erhitzt. Die Lösung trübte sich und wurde mit 270 ccm absol. Äther versetzt. Nach 1stdg. Stehenlassen in der Kühltruhe bei -15° wurde der Äther dekantiert und der Niederschlag mit frischem Äther durchgeschüttelt. Nach weiterem Stehenlassen in der Kälte wurde der Niederschlag abgesaugt, zur Nachveresterung in 1*n* methanol. HBr gelöst, mit Äther gefällt und wieder in die Kühltruhe gestellt. Daraufhin wurde er aus Methanol-Äther umkristallisiert. Ausb. 96% d. Th.; Schmp. 176-178°. Die Substanz war kristallin und chromatographisch einheitlich.

$C_8H_{16}O_4N_3 \cdot HBr$ (298.1) Ber. N 14.1 Br 26.9 Gef. N 14.1 Br 27.0

GGA-M: 500 mg GGA-M-HBr wurden in 8 ccm absol. Methanol gelöst und auf 0° gekühlt. Zur Freisetzung des Esters wurden nach E. Fischer¹¹⁾ 0.98 ccm Natrium-methylat-Lösung, 37.4 mg Na enthaltend, zugegeben. Die Lösung wurde 1/2 Stde. in Eiswasser geschüttelt. Danach wurde das Methanol i. Vak. abgedampft.

2. Derivate des 4-Peptids

Die Synthese von Cbzo-GGAG-M erfolgte nach der Phosphorazo-Methode, analog wie die von Cbzo-GGA-M. Ausb. 42% d. Th.; Schmp. 166°.

$C_{18}H_{24}O_7N_4$ (408.4) Ber. N 13.7 Cbzo 33 Gef. N 13.6 Cbzo 34

GGAG-M-HBr: Die Abspaltung des Cbzo-Rests erfolgte nach Anderson⁴⁾, wie bei GGA-M-HBr beschrieben. Die Kristallisation verlief jedoch nicht so glatt. Beim Umkristallisieren wurde deshalb die methanol. Lösung mit Kohlensäure-Schnee gekühlt, vorsichtig mit Äther ausgefällt und einen Tag im Kohlensäure-Schnee stehen gelassen. Diese Umfällung wurde mehrmals wiederholt. Danach wurde der zuerst klebrige Niederschlag flockig und konnte abgesaugt werden. Die Substanz wurde mit Äther gewaschen und danach sofort in den Vak.-Exsiccator gebracht, da sie sehr hygroskopisch war. Ausb. 81% d. Th. chromatographisch einheitlicher Substanz.

$C_{10}H_{18}O_6N_4 \cdot HBr$ (355.2) Ber. N 15.8 Br 22.5 Gef. N 14.9 Br 24.6

GGAG-M: Die Freisetzung des Esters erfolgte mit Natriummethylat, wie bei GGA-M beschrieben.

3. Derivate des 5-Peptids

Die Synthese von Cbzo-GGAGG erfolgte nach Wieland³⁾, wie beim Cbzo-GGA beschrieben, aus Cbzo-GGA in Dioxan-Aceton (1:1) mit Tributylamin und Chlorameisensäure-octylester und Glycin-anhydrid in Natronlauge. Ausb. 68% d. Th.; Schmp. 192°.

$C_{19}H_{26}O_6N_5$ (451.4) Ber. N 15.5 Cbzo 30 Gef. N 15.4 Cbzo 29

Cbzo-GGAGG-M: Die Lösung von 4.5 g (0.01 Mol) Cbzo-GGAGG in 200 ccm Methanol und 20 ccm Wasser wurde mit einer äther. Lösung von Diazomethan aus 14 g Nitrosomethylharnstoff bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt, wobei bald Kristallisation eintrat. Nach 12stdg. Aufbewahren bei -15° wurden die Kristalle abgesaugt und mit Äther ausgewaschen. Ausb. 70% d. Th.; Schmp. 200°.

$C_{20}H_{27}O_6N_5$ (465.5) Ber. N 15.1 Cbzo 29 Gef. N 14.7 Cbzo 27

GGAGG-M-HBr: Die Abspaltung des Cbzo-Rests erfolgte, wie beim GGAG-M-HBr beschrieben. Die Substanz war sehr hygroskopisch. Ausb. 82% d. Th. chromatographisch einheitlicher Substanz.

$C_{12}H_{21}O_6N_5 \cdot HBr$ (412.3) Ber. N 17.0 Br 19.4 Gef. N 15.6 Br 20.2

4. Derivate des 6-Peptids

Die Synthese von Cbzo-GGAGGA wurde, wie bei Cbzo-GGAGG beschrieben, aus Cbzo-GGA und GGA durchgeführt. Ausb. 25.4% d. Th.; Schmp. 214°.

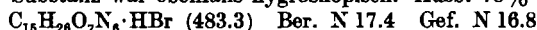
$C_{22}H_{30}O_6N_6$ (522.5) Ber. N 16.1 Cbzo 26 Gef. N 15.9 Cbzo 27

Cbzo-GGAGGA-M: Die Veresterung erfolgte, wie bei Cbzo-GGAGG-M beschrieben. Ausb. 87% d. Th.; Schmp. 178°.

$C_{22}H_{32}O_6N_6$ (536.6) Ber. N 15.7 Gef. N 15.5

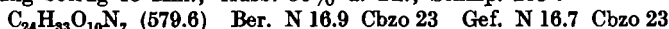
¹¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 453, 2893 [1906].

GGAGGA-M-HBr: Der Cbzo-Rest wurde, wie beim GGAG-M-HBr beschrieben, abgespalten. Die Substanz war ebenfalls hygroskopisch. Ausb. 78% d. Theorie.

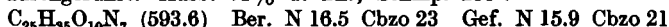


5. Derivate des 7-Peptids

Die Synthese von Cbzo-GGAGGAG erfolgte, wie beim Cbzo-GGA beschrieben, aus Cbzo-GGAGG in Diäthylformamid mit Tributylamin und Chlorameisensäure-octylester und Alanylglycin in Natronlauge. Die Reaktionszeit für die Anhydridbildung betrug 15 Min.; Ausb. 36% d. Th.; Schmp. 203°.



Cbzo-GGAGGAG-M: Die Veresterung wurde, wie beim Cbzo-GGAGG-M beschrieben, durchgeführt. Ausb. 71% d. Th.; Schmp. 238°.

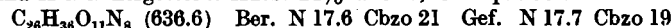


GGAGGAG-M-HBr: Die Abspaltung des Cbzo-Rests erfolgte, wie beim GGAG-M-HBr beschrieben. Die Substanz war hygroskopisch und schlecht löslich in Methanol. Chromatographisch war sie nicht ganz einheitlich. Mit der Chlormethode wurde ein Fleck gefunden, der nicht geklärt werden konnte. Es handelte sich weder um eine Carbobenzoxy-Verbindung, noch um ein Diketopiperazin, noch um GGA-M-HBr. Ausb. 72% d. Th.; Schmp. 128° (Zers.).

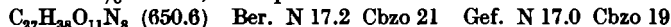


6. Derivate des 8-Peptids

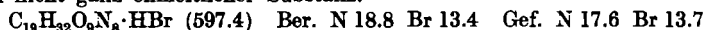
Cbzo-GGAGGAGG wurde, wie bei Cbzo-GGAGGAG beschrieben, aus Cbzo-GGAGG und AG hergestellt. Ausb. 24% d. Th.; Schmp. 206°.



Cbzo-GGAGGAGG-M: Die Veresterung erfolgte, wie bei Cbzo-GGAGG-M beschrieben. Ausb. 83% d. Th.; Schmp. 240°.



GGAGGAGG-M-HBr: Der Cbzo-Rest wurde, analog wie beim GGAG-M-HBr beschrieben, abgespalten. Die Substanz war hygroskopisch. Ausb. 80% d. Th. chromatographisch nicht ganz einheitlicher Substanz.



Tafel 4. R_F -Werte der Ausgangs- und Vergleichssubstanzen in Butanol-Pyridin-Wasser

Kettengliederzahl	Cbzo-Ester	Cbzo-Peptid	Ester-hydrobromid
3 GGA	0.97	0.74	0.50
4 GGAG	0.93	—	0.42
5 GGAGG	0.85	0.46	0.34
6 GGAGGA	0.91	0.46	0.37
7 GGAGGAG	0.75	0.40	0.22
8 GGAGGAGG	0.72	0.35	0.22
2 Diketopiperazine (AG) 0.54 (GG) 0.38			

7. Darstellung der DNP-Derivate

DNP-Peptidmethylester: Umsetzung: 1 Mol. Peptidester-hydrobromid + 1 Mol. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 3 Moll. Dinitrofluorbenzol.

Die Lösung von 0.3 mMol Peptidester-hydrobromid in 2 ccm Methanol wurde unter Eiskühlung mit 0.9 mMol Dinitrofluorbenzol, gelöst in 2 ccm Methanol, und 0.3 mMol $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 2 ccm Wasser 2 Stdn. bei 0° geschüttelt. Anschließend wurde

der ausgefallene gelbe DNP-Ester in 100 ccm Methanol gelöst, von den Ca-Salzen abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingeengt. Der Ester wurde mit Äther ausgefällt, abgesaugt und mit Äther ausgewaschen. Anschließend wurde der Ester mit Essigester und Wasser geschüttelt, die Lösung mehrmals mit Essigester gezogen und mit Natriumsulfat getrocknet. Dann wurde abgesaugt und die Essigesterlösung eingeengt. Auf Zusatz von wenig Petroläther trat die Kristallisation ein. Die höheren DNP-Peptidester, von 5 Aminosäuren an aufwärts, waren in Essigester nicht mehr löslich. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Methanol-Äther. Die Löslichkeitseigenschaften der Peptidesterhydrobromide sind leider die gleichen wie die der DNP-Peptidester.

Ausbeuten, Analysenwerte, Schmelzpunkte, R_F -Werte und die im Infrarot bestimmte Kettengliederzahl zeigt Tafel 5. Die N-Bestimmung in den DNP-Substanzen fällt immer etwas zu nieder aus.

DNP-Peptide: Umsetzung: 1 Mol. Peptidester-hydrobromid + $\frac{3}{2}$ Moll. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 3 Moll. Dinitrofluorbenzol.

Die Lösung von 0.3 mMol Peptidester-hydrobromid in 2 ccm Methanol wurde zur Verseifung mit 0.45 mMol $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 2 ccm Wasser 4 Stdn. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Danach wurde unter Kühlung mit Eiswasser 0.9 mMol Dinitrofluorbenzol, gelöst in 2 ccm Methanol, zugegeben und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Durch Zusatz von 200 ccm Methanol und 20 ccm Wasser ging der gelbe Niederschlag in Lösung. Von ungelösten Ca-Salzen wurde abfiltriert, das Methanol i. Vak. abgedampft, die wäbr. Lösung dreimal ausgeäthert, i. Vak. oder durch Gefriertrocknung eingeengt, mit Methanol versetzt und mit Äther gefällt. Der gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und mit Äther ausgewaschen. Falls die Substanz noch nicht rein war (freies Peptid enthielt), wurde sie durch Papierchromatographie gereinigt, mit Wasser eluiert, gefriergetrocknet, mit 0.5 ccm Wasser und 2 ccm Methanol in Lösung gebracht und mit Äther ausgefällt. Ausbeuten, Schmelzpunkte, Analysenwerte und R_F -Werte zeigt Tafel 5.

DNP-GGA wurde nach der Sanger-Methode in NaHCO_3 umgesetzt und mit Essigester extrahiert.

Tafel 5. Charakterisierung der DNP-Peptidmethylester und DNP-Peptide

Verbindung	Ausb. in %	Schmp.°	N		DNP		Z	R_F	
			ber.	gef.	ber.	gef.		But-Py-W	But-Essigs
DNP-GGA-M	58	176	18.3	15.8	44	40	2.9	0.88	0.78
DNP-GGAG-M	80	218	19.1	17.7	38	40	4.5	0.86	0.70
DNP-GGAGG-M	67	218	19.7	17.4	34	29	5.8	0.82	0.64
DNP-GGAGGA-M	—	204	19.7	18.1	29	27	6.2	0.81	0.59
DNP-GGAGGAG-M	—	—	20.0	14.6	27	—	7.8	0.79	0.53
DNP-GGAGGAGG-M	66	—	20.6	17.9	25	21	7.8	0.81	0.51
DNP-GG	64	200	18.8	18.5	56	56	1.7	0.59	0.75
DNP-GGA	69	205	19.0	18.4	45	45	2.7	0.59	0.70
DNP-GGAG	82	195	19.7	17.0	39	37	4.6	0.56	0.55
DNP-GGAGG	85	232	20.3	18.6	35	33	5.2	0.55	0.52
DNP-GGAGGA	70	229	20.3	17.1	30	26	6.3	0.48	0.48
DNP-GGAGGAG	—	208	20.6	18.8	27	24	7.8	0.44	0.38
DNP-GGAGGAGG	87	—	20.9	18.5	25	23	8.5	0.39	0.25

Z = durch Infrarotmessung erhaltene Zahl der Aminosäurereste, But-Py-W = Butanol-Pyridin-Wasser, But-Essigs = Butanol-Essigsäure.

B. Durchführung der Kondensation

0.3 mMol Peptidester wurden in demselben Kolben, in dem sie freigesetzt worden waren, zur Kondensation in einen Vakuumtrockenschrank gebracht und bei 10^{-2} Torr 1.5 Stdn. auf 110° erhitzt. Danach wurde das gelblich bis rotbraun gefärbte Kondensationsprodukt in 2 ccm Methanol und 2 ccm Wasser gelöst. Zum Verseifen wurden 0.3

mMol $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zugegeben und bei Zimmertemperatur 4 Stdn. geschüttelt. Anschließend wurden 0.9 mMol Dinitrofluorbenzol in 2 ccm Methanol zugefügt und 1 Stde. bei Zimmertemperatur geschüttelt (Umsetzung: 1 Mol. Peptidester + 1 Mol. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 3 Moll. Dinitrofluorbenzol). Der gelbe Niederschlag wurde in 150 ccm Methanol und 50 ccm Wasser gelöst und vom wenigen Ungelösten (Ca-Salze) abfiltriert. Das Methanol wurde i. Vak. abgedampft und die wäbr. Lösung dreimal ausgeäthert. Aus der wäbr. Lösung wurden die Ätherspuren durch Einengen i. Vak. entfernt und die Lösung der Gefrier-trocknung unterworfen. Das DNP-Peptidgemisch wurde so als gelbes Pulver erhalten.

Etwa 50 mg der DNP-Peptide wurden auf einem Bogen Schleicher & Schüll-Papier 2043 a, 60×58 cm, aufgetragen und absteigend chromatographiert. Für die niederen Peptide eignet sich das System nach Partridge (Butanol-Eisessig-Wasser 40:10:50) am besten, für die höheren wurde Butanol-Pyridin-Wasser (65:35:65) verwendet. Zur Trennung der höheren Peptide empfiehlt es sich, das Lösungsmittel über den Papierrand abtropfen zu lassen. Die Identifizierung der einzelnen Banden wurde durch Vergleichs-substanzen, die auf demselben Bogen mitliefen, erleichtert. Um die Ergebnisse festzuhalten, wurden von den Chromatogrammen Kontaktabzüge hergestellt. Hierzu wurde eine 80-Watt-Quecksilber-Lampe und Agepe-Papier benützt.

Die Bestimmung der Kettenlänge durch Messung der Infrarotabsorption nach Schiedt und Restle⁶⁾ wird leicht durch Verunreinigungen gestört. Es darf daher in diesem Fall nur ein Papier verwendet werden, das vorher mit Wasser ausgewaschen wurde; solches Papier kann auch käuflich bezogen werden. Die Elution der Banden erfolgte in diesem Fall mit aqua bidest., das durch vorheriges Auskochen vollständig von CO_2 befreit wurde. Das Eluat wurde nach Zusatz von 350 mg KBr gefriergetrocknet, zu Tabletten gepreßt und im Infrarot vermessen. Die Messungen stimmten stets gut mit den zu erwartenden Werten überein, außer wenn die Konzentration der DNP-Peptide zu gering war; dann machten sich die unvermeidlichen Verunreinigungen störend bemerkbar.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurden die einzelnen Banden mit Wasser oder Methanol eluiert und die Extinktion im Beckman-Spektralphotometer bestimmt. Für die Molextinktion des DNP-Restes wurde ein Wert von 14500 bei 360 μ zugrunde gelegt und an Hand der bekannten Kettenlänge die Ausbeute an den einzelnen Banden in Prozenten der Gesamtmenge an DNP-Derivaten berechnet.

Kontrollversuche mit reinen DNP-Verbindungen zeigten, daß diese bei Behandlung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH und NaHCO_3 spurenweise zu höheren DNP-Verbindungen kondensieren. Wahrscheinlich reagiert die substituierte Aminogruppe unmittelbar mit der Estergruppe, denn wenn man die Peptidester erst mit Alkali behandelt und dann unter Vermeidung eines Überschusses von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mit Dinitrofluorbenzol umsetzt, erhält man keine Kondensation. Der durch die Kondensation der DNP-Peptide verursachte Fehler kann jedoch auf jeden Fall vernachlässigt werden. Auf dem Chromatogramm finden sich wegen der unvollständigen Verseifung des Ausgangsgemisches außer den DNP-Peptiden auch noch spurenweise DNP-Peptidester.

Um auch die Anwesenheit anderer ungefärbter Substanzen zu prüfen, wurden die Chromatogramme zusätzlich noch nach der Chlormethode von H. N. Rydon und P. W. G. Smith¹²⁾ untersucht. Hierbei werden alle Substanzen sichtbar, die eine CO-NH-Gruppierung enthalten, z. B. Diketopiperazine und substituierte Peptide. Die Prüfung der Substanzen mit freier Aminogruppe erfolgte außerdem durch die übliche Besprühung mit Ninhydrin (0.1-proz. Lösung). Diese Prüfungen sind vor allem wichtig, um die Zuverlässigkeit der Werte bei der Infrarotmessung zu kontrollieren. Falls die gelben DNP-Banden noch mit Ninhydrin oder bei der Chlormethode reagierten, wurden sie rechromatographiert. Zur Entfernung der ninhydrin- und chlor-positiven Substanzen eignet sich besonders gut das System Isoamylalkohol-Phenol-Wasser (1:1:1, Ammoniak stationär 0.1%) und das System Phenol-Wasser (80:20). Um das bei der Infrarotmessung störende Phenol zu entfernen, ist allerdings eine nochmalige Chromatographie in Butanol-Pyridin-Wasser notwendig.

¹²⁾ Nature [London] 160, 922 [1952].