

eingedampft. Dieses Verfahren wurde dreimal wiederholt, beim letzten Mal kurz auf 40 bis 50° erwärmt. Farblose Kristalle aus Methanol/Äther: Schmp. 116–117°. Ausb. 16 g (86 % d. Th.).

24. *Carbobenzoxy-glycyl-L-asparaginsäure-dimethylester*: 9.88 g *L-Asparaginsäure-dimethylester-hydrochlorid* wurden in 100 ccm Pyridin gelöst und nach Zugabe von 2.18 ccm Phosphor(III)-chlorid mit 11 g *Carbobenzoxy-glycin* umgesetzt. Die übliche Aufarbeitung lieferte ein Öl. Ausb. 17.2 g (95 % d. Th.).

25. *Carbobenzoxy-glycyl-L-asparaginsäure*: 17.2 g öliges *Carbobenzoxy-dipeptidester* in 100 ccm Dioxan wurden mit 100 ccm *n* NaOH während 40 Min. verseift. Nach üblicher Aufarbeitung hinterblieb ein Sirup, der im Vakuumexsikkator über P₂O₅ zu einer festen, sehr hygroskopischen weißen Masse erstarrte. Ausb. 13.2 g (89 % d. Th.).

26. *Glycyl-L-asparaginsäure*: 12.6 g *Carbobenzoxy-dipeptid* wurden wie üblich entacyliert. Farblose Prismen aus Wasser + Alkohol. Ausb. 5.8 g (80 % d. Th.); $[\alpha]_D^{25}$: $+12.6 \pm 0.2^\circ$ ($c = 5$; H₂O), für das wasserfreie Peptid. (Lit.¹⁾; $[\alpha]_D^{25}$: $+12.52^\circ$)

C₆H₁₀N₂O₅ + H₂O (208.1) Ber. C 34.62 H 5.81 N 13.46 Gef. C 34.46 H 5.89 N 13.11

WOLFGANG GRASSMANN, ERICH WÜNSCH*) und ALFRED RIEDEL **)

Beiträge zur Peptidsynthese, II¹⁾

Die Darstellung optisch-aktiver höherer Peptide nach der Phosphorazomethode

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

(Eingegangen am 14. Dezember 1957)

Die Synthese höherer Peptide nach der Phosphorazomethode wurde eingehend studiert. Am Beispiel des Tripeptids Glycyl-phenylalanyl-alanin konnte gezeigt werden, daß bei der Synthese von Tri- und höheren Peptiden aus Carbobenzoxy-peptiden mit carboxyl-endständiger optisch-aktiver Aminosäure und Aminosäure- bzw. Peptidestern in Pyridin als Lösungsmittel teilweise Racemisierung eintritt.

Nach der von St. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER²⁾ gegebenen Standardvorschrift zur Synthese von Peptiden mit Hilfe von Phosphorazoverbindungen ist auch die Verknüpfung von Aminosäuren und Peptiden miteinander möglich. Hierbei sollte es gleichgültig sein, ob z. B. bei der Darstellung von Tripeptiden eine Carbo-

*) Dissertat., Univ. München 1955. **) Dissertat., Univ. München 1956.

1) I. Mitteil.: W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. **91**, 449 [1958], vorstehend.

2) Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 [1953].

hydrogenolytische Entacylierung von I und II lieferte chromatographisch gleichartige und einheitliche Tripeptide.

Wir haben daraufhin die Darstellung des Tripeptids Glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin auch aus Carbobenzoxy-glycin und L-Phenylalanyl-L-alanin-methylester mit Hilfe der WIELAND-BOISSONAS-VAUGHANSEN Anhydridmethode durchgeführt. Nach den bisher bekannten Ergebnissen⁴⁾ ist hierbei die volle Erhaltung der optischen Aktivität der beteiligten Aminosäuren gesichert. Schon der als erste Stufe erhaltene Carbobenzoxy-tripeptidester zeigte einen für optisch reine Verbindungen charakteristischen scharfen Schmelzpunkt; die alkalische Verseifung erbrachte ein einheitliches Carbobenzoxy-tripeptid (III), dessen Schmelzpunkt um einige Grade höher lag als beim Produkt I und dessen spezifischer Drehwert gegenüber letzterem angestiegen war (Tab. 1).

Tab. 1. Daten der Carbobenzoxy-tripeptide I, II und III

Derivat	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ (c = 2; Methanol)
Z-Gly-Phe-Ala-OH (I)	152 *)	-5.6 ± 0.5°
Z-Gly-Phe-Ala-OH (II)	108–109 *)	+8.0 ± 0.5°
Z-Gly-Phe-Ala-OH (III)	165–166	-8.6 ± 0.5°

Z = Carbobenzoxy *) = unscharf

Aufschluß über den optischen Reinheitsgrad der Verbindungen I, II und III sollte sehr einfach aus ihrem Abbau mit Carboxypeptidase erhalten werden. Dieses Enzym hat offenbar eine absolute stereochemische Spezifität; z. B. sind die Carbobenzoxy-glycin-Derivate von D-Phenylalanin^{5,6,7)}, D-Leucin⁷⁾, D-Methionin⁸⁾ und D-Tryptophan⁹⁾ vollkommen resistent. Darüber hinaus erstreckt sich diese Spezifität auch auf den Aminosäurerest, der der carboxyl-endständigen Aminosäure benachbart ist. So wird z. B. nach SMITH^{9,10)} Carbobenzoxy-D-tryptophyl-glycin im Gegensatz zum L-Analogen nicht hydrolysiert. Des weiteren konnten NEURATH und Mitarb.¹¹⁾ sowie RIEDEL **) in quantitativen Studien zeigen, daß das vorliegende Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin ein sehr empfindliches Substrat für Carboxypeptidase sein muß; denn einerseits wird an Phenylalanin gebundenes Alanin relativ gut abgespalten, und andererseits ist das danach verbleibende Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanin das empfindlichste z. Z. bekannte Carboxypeptidase-Substrat.

Bei dem Produkt III, dessen optische Reinheit nach Herstellung anzunehmen war, war die Abspaltung von Alanin und Phenylalanin schon nach einer Viertelstunde praktisch beendet. Aber auch beim hochschmelzenden Produkt I spricht der Hydrolyseverlauf für ein hochprozentiges L-L-Derivat. An der Fraktion II dagegen war nur eine geringe Abspaltung der beiden Aminosäuren eingetreten; hier handelt es sich also im wesentlichen um Carbobenzoxy-glycyl-D-phenylalanyl-L-alanin. Titrimetrisch wie chromatographisch (quantitative kolorimetrische Auswertung) konnte bei I

5) E. ELKINS-KAUFMANN und H. NEURATH, J. biol. Chemistry **175**, 893 [1948].

6) H. NEURATH, E. ELKINS und S. KAUFMANN, J. biol. Chemistry **170**, 221 [1947].

7) M. A. STAHMANN, J. S. FRUTON und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **164**, 753 [1946].

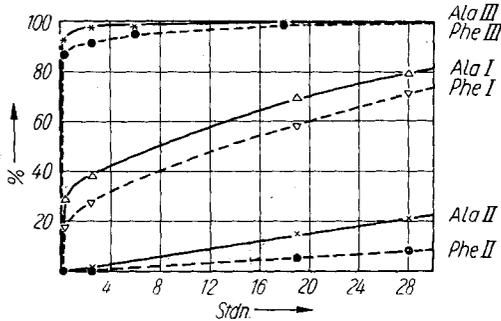
8) C. A. DEKKER, S. E. TAYLOR JR. und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **180**, 155 [1949].

9) H. T. HANSEN und E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **179**, 815 [1949].

10) E. L. SMITH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 80 [1948].

11) H. NEURATH und G. W. SCHWERT, Chem. Reviews **46**, 69 [1950].

eine 80-proz. Abspaltung von Alanin und Phenylalanin, bei II eine von ca. 12% jeweils nach 28 stdg. Einwirkung des Enzyms ermittelt werden (s. Abbild.).



Abbau von
Z-Gly-Phe-Ala-OH (I, II und III)
mit Carboxypeptidase.
Substrat zu Enzym 50:1;
Abszisse: Inkubationszeit in Stdn.
Ordinate: Abbau in %

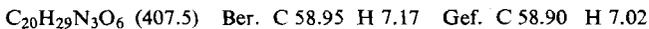
Auch die Synthese von Glycyl-L-leucyl-L-glutaminsäure, Glycyl-L-phenylalanyl-L-glutaminsäure und L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-glycin aus den Carbobenzoxy-di- bzw. tripeptiden und Aminosäure- bzw. Dipeptidestern führte zu sehr unscharf schmelzenden und schlecht kristallisierenden Carbobenzoxy-Derivaten, obgleich die schließlich erhaltenen Tripeptide bzw. der freie Pentapeptidester chromatographisch rein waren. Leider gelang uns in den oben genannten Fällen keine Trennung von Diastereomeren durch fraktionierte Kristallisation wie im Falle von Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanyl-alanin.

Die Versuche zeigten, daß bei der Synthese höherer Peptide mittels der Phosphorazomethode aus Carbobenzoxy-peptid und Aminosäureester (Peptidester) mit teilweisem Verlust der optischen Aktivität der carboxyl-endständigen Aminosäure des Kopfpartners gerechnet werden muß. Die Darstellung optisch reiner höherer Peptide dürfte daher auf folgende Varianten beschränkt sein:

1. Umsetzung von Carbobenzoxy-aminosäuren mit der Phosphorazoverbindung von Peptidestern.
2. Umsetzung von Carbobenzoxy-peptiden mit carboxyl-endständigem Glycin oder Prolin¹²⁾ mit Phosphorazoverbindungen von Aminosäure- bzw. Peptidestern.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE*)

1. *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycyl-glycin-äthylester*: 7.5 g *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycin* wurden mit der Phosphorazolösung aus 2.35 g *Glycinester* und 0.99 ccm Phosphor(III)-chlorid in 75 ccm Pyridin wie üblich umgesetzt und aufgearbeitet¹⁾. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 106° (Lit.¹³⁾: Schmp. 105°). Ausb. 7.5 g (81 % d. Th.).



¹²⁾ Vgl. dazu F. WEYGAND und M. REIHER, Chem. Ber. **88**, 26 [1955].

*) Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Elementaranalysen wurden im Untersuchungslabor der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik (Leitung Prof. Dr. WURZSCHMITT) durchgeführt.

¹³⁾ H. S. SCHOTT, J. B. LARKIN, L. B. ROCKLAND und M. S. DUNN, J. org. Chemistry **12**, 490 [1947].

1a) *Carbobenzoxy-DL-leucyl-glycyl-glycin-äthylester*: Aus 55 g krist. *Carbobenzoxy-DL-leucin* und der Phosphorazolösung aus 40 g *Diglycinester-hydrochlorid* und 8.85 ccm Phosphor(III)-chlorid in 600 ccm Pyridin. Farblose Nadeln aus Essigester/Petroläther. Schmp. 102°. Ausb. 68.5 g (84 % d. Th.).

$C_{20}H_{29}N_3O_6$ (407.5) Ber. C 58.95 H 7.17 N 10.31 Gef. C 58.97 H 6.92 N 10.28

2. *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycyl-glycin*: 7.1 g *Carbobenzoxy-tripeptidester* in 20 ccm Dioxan wurden mit 17.6 ccm *n* NaOH versetzt und $\frac{1}{2}$ Stde. bei Zimmertemperatur belassen. Nach Ansäuern nahm man das ausgefallene Öl in Essigester auf und reinigte das Produkt durch eine „Kaliumhydrogencarbonat-Extraktion“. Die weitere Aufarbeitung ergab farblose Kristalle aus Essigester/Petroläther. Schmp. 143° (Lit.¹³): 144–145°). Ausb. 5.4 g (82 % d. Th.).

$C_{18}H_{25}N_3O_6$ (379.4) Ber. C 56.98 H 6.64 Gef. C 57.30 H 6.68

2a) *Carbobenzoxy-DL-leucyl-glycyl-glycin*: 40.7 g *Carbobenzoxy-tripeptidester* in 250 ccm Methanol + 50 ccm Wasser wurden mit 100 ccm *n* NaOH in Portionen zu 1 ccm unter Kontrolle des Laugenverbrauchs mit Thymolphthalein als Indikator bei Raumtemperatur und unter Rühren verseift. Nach üblicher Aufarbeitung resultierte ein farbloser Sirup. Ausb. 34.4 g (91 % d. Th.).

3. *L-Leucyl-glycyl-glycin*: 3.8 g *Carbobenzoxy-tripeptid* wurden wie üblich katalytisch entacyliert und aufgearbeitet. Farblose Nadelchen aus Wasser/Propanol-(2). Ausb. 2 g (81 % d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: +59.2 ± 1° (*c* = 2; H₂O) (Lit.¹³): $[\alpha]_D^{20}$: +58.3°).

$C_{10}H_{19}N_3O_4$ (245.3) Ber. C 48.98 H 7.75 Gef. C 48.83 H 8.0

3a) *DL-Leucyl-glycyl-glycin*: 34.4 g *Carbobenzoxy-tripeptid* (Sirup) wurden wie üblich hydriert und aufgearbeitet. Farblose Nadeln aus Wasser/Alkohol. Ausb. 18.7 g (84 % d. Th.).

$C_{10}H_{19}N_3O_4$ (245.3) Ber. C 48.98 H 7.75 Gef. C 48.78 H 7.56

4. *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycyl-glycyl-glycin-äthylester*: Aus 5.5 g *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycin* und der Phosphorazolösung aus 3.3 g *Diglycinester-hydrochlorid* und 0.73 ccm Phosphor(III)-chlorid in 50 ccm Pyridin. Das erhaltene Öl kristallisierte aus Alkohol nach Zusatz von Wasser beim Aufbewahren im Eisschrank: Schmp. 75°. Ausb. 6.4 g (82 % d. Th.).

$C_{22}H_{32}N_4O_7$ (464.5) Ber. C 56.88 H 4.52 Gef. C 56.7 H 4.71

5. *Carbobenzoxy-L-leucyl-glycyl-glycyl-glycin*: 4.6 g *Carbobenzoxy-tetrapeptidester* in 10 ccm Dioxan wurden mit 10 ccm *n* NaOH, wie unter 2a) beschrieben, verseift. Nach üblichem Aufarbeiten kristallisierte das *Carbobenzoxy-Derivat* beim Eindampfen der Lösung. Nach Umkristallisieren aus heißem Essigester: Schmp. 158–159°. Ausb. 3.2 g (75 % d. Th.).

$C_{20}H_{28}N_4O_7$ (436.4) Ber. C 55.03 H 6.47 Gef. C 55.0 H 6.38

6. *L-Leucyl-glycyl-glycyl-glycin*: 2.18 g *Carbobenzoxy-tetrapeptid* wurden wie üblich entacyliert und aufgearbeitet. Das Tetrapeptid kristallisierte nach Aufnehmen in sehr wenig heißem, verdünntem Alkohol nach Zugabe von absol. Alkohol. Ausb. 1.4 g (92 % d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: +46.1 ± 1° (*c* = 2; H₂O) (Lit.¹⁴): $[\alpha]_D^{20}$: +45.9°).

$C_{12}H_{22}N_4O_5$ (302.3) Ber. C 47.63 H 7.32 Gef. C 47.9 H 7.42

7. *Carbobenzoxy-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester*: Aus 15.5 g *Carbobenzoxy-L-prolyl-glycin* und der Phosphorazolösung aus 10.78 g *L-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid* und 2.18 ccm Phosphor(III)-chlorid in 150 ccm Pyridin. Das resultierende, fast farblose Öl kristallisierte beim Aufbewahren im Vakuumexsikkator über P₂O₅. Farblose Nadeln aus Essigester/Petroläther. Schmp. 92–93°. Ausb. 20.3 g (87 % d. Th.).

$C_{25}H_{29}N_3O_6$ (467.5) Ber. C 64.22 H 6.14 N 8.99 Gef. C 63.97 H 6.25 N 8.69

¹⁴) E. FISCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 2893 [1906].

8. *Carbobenzoxy-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanin*: 9.35 g *Carbobenzoxy-tripeptidester* in 20 ccm Dioxan wurden mit 20 ccm *n* NaOH wie üblich verseift. Farblose Kristalle aus Essigester/Petroläther: Schmp. 160°. Ausb. 7 g (77 % d. Th.).

$C_{24}H_{27}N_3O_6$ (453.5) Ber. C 63.56 H 6.00 N 9.26 Gef. C 63.73 H 6.22 N 9.11

9. *L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanin*: 1.52 g *Carbobenzoxy-tripeptid* wurden wie üblich entacyliert und aufgearbeitet. Feine Nadeln aus Wasser/Alkohol. Ausb. 0.9 g (84 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $+14.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; H_2O).

$C_{16}H_{21}N_3O_4$ (319.4) Ber. C 60.17 H 6.63 N 13.16 Gef. C 59.92 H 6.45 N 13.09

10. *L-Alanin-methylester-hydrochlorid*: 22.3 g ($1/10$ Mol) *Carbobenzoxy-L-alanin* wurden in 150 ccm absol. Äther gelöst; unter Eiskühlung und Rühren ließ man nun eine ätherische *Diazomethan*-Lösung bis zur wahrnehmbaren Gelbfärbung zutropfen. Der Überschuß an *Diazomethan* wurde mit wenig Eisessig zerstört. Nach Waschen der ätherischen Lösung mit $KHCO_3$ -Lösung und Wasser wurde über Natriumsulfat getrocknet. Der *Carbobenzoxy-methylester* wurde nach Abdampfen des Äthers i. Vak. als fester weißer Rückstand erhalten. Ausb. praktisch quantitativ.

Das Alaninderivat wurde ohne weitere Charakterisierung in 250 ccm absol. Methanol gelöst und in Gegenwart von 1 g Palladiumschwarz und 0.15 Mol methanol. HCl unter völligem Ausschluß von Feuchtigkeit hydriert. Der nach üblichem Aufarbeiten erhaltene Rückstand kristallisierte aus heißem absol. Methanol + absol. Äther. Lange farblose Nadeln vom Schmp. 109–110°. Ausb. 12.4 g (89 % d. Th.).

$C_4H_9NO_2 \cdot HCl$ (139.6) Ber. N 10.03 Cl 25.4 Gef. N 9.95 Cl 25.2

Das von uns erstmals kristallisiert erhaltene Esterhydrochlorid ist ungewöhnlich stark hygroskopisch.

11. *Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-alanin-methylester*: 3.61 g *L-Alanin-methylester-hydrochlorid* (im Reaktionskolben i. Vak. über P_2O_5 getrocknet und dann die Einwaage bestimmt) wurden mit 1.13 ccm Phosphor(III)-chlorid in 100 ccm Pyridin zur Phosphorazoverbindung umgesetzt und mit 7.91 g *Carbobenzoxy-L-phenylalanin* wie üblich zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurden feine zu Drusen vereinigte Spieße aus Essigester/Petroläther erhalten: Schmp. 130–131°. Ausb. 8 g (81 % d. Th.).

$C_{21}H_{24}N_2O_5$ (384.4) Ber. C 65.62 H 6.29 N 7.29 Gef. C 65.72 H 6.39 N 7.18

12. *Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-alanin*: 1.9 g *Carbobenzoxy-peptidester* in 15 ccm wäßrigem Dioxan wurden mit 5 ccm *n* NaOH wie üblich verseift und aufgearbeitet. Farblose Kristalle aus Essigester/Petroläther. Schmp. 165°. Ausb. 1.65 g (90 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $-11.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Alkohol).

$C_{20}H_{22}N_2O_5$ (370.4) Ber. C 64.85 H 5.99 N 7.56 Gef. C 64.57 H 6.08 N 7.44

13. *L-Phenylalanyl-L-alanin*: 1.29 g *Carbobenzoxy-dipeptid* wurden wie üblich entacyliert und aufgearbeitet. Nach Aufnehmen in 90-proz. heißem Methanol und Zugabe von warmem absol. Alkohol sowie schließlich etwas absol. Äther konnten farblose, zu Sternchen vereinigte, sehr hygroskopische Nadeln erhalten werden. Ausb. 0.65 g (80 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $+12.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; H_2O).

$C_{12}H_{16}N_2O_3$ (236.3) Ber. C 61.00 H 6.83 N 11.86 Gef. C 60.91 H 7.05 N 11.71

14. *Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanyl-alanin-methylester*: *Methode A*: Aus 2.82 g *L-Alanin-methylester-hydrochlorid* und 0.885 ccm Phosphor(III)-chlorid wurde eine Phosphorazolösung in 100 ccm Pyridin hergestellt und mit 7.3 g *Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanin* umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisierte der *Carbobenzoxyester* aus Essigester/Petroläther: Schmp. 116–119°. Ausb. 7.6 g (80 % d. Th.).

$C_{23}H_{27}N_3O_6$ (441.5) Ber. C 62.57 H 6.10 N 9.52 Gef. C 62.32 H 6.16 N 9.59

15. *Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanyl-alanin*: 4.41 g *Carbobenzoxy-tripeptidester* in 30 ccm Dioxan-Wasser (5:1) wurden, wie unter 2a) beschrieben, mit 10 ccm *n* NaOH in Portionen zu 0.2 ccm verseift. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisierte die Verbindung aus Essigester/Petroläther. Ausb. 4.25 g (fast quantitativ).

Das erhaltene Produkt konnte durch fraktionierte Kristallisation aus Essigester in zwei Komponenten aufgespalten werden:

Fraktion I: Schmp. 152° (unscharf) aus Essigester. Ausb. 3.1 g; $[\alpha]_D^{20}$: $-5.6 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Methanol).

$C_{22}H_{25}N_3O_6$ (427.4) Ber. C 61.81 H 5.90 N 9.83 Gef. C 62.01 H 5.85 N 9.59

Fraktion II: Aus dem Mutterlaugenrückstand von I nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther: Schmp. 108–109° (unscharf); $[\alpha]_D^{20}$: $+8.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Methanol). Ausb. 0.7 g.

$C_{22}H_{25}N_3O_6$ (427.4) Ber. C 61.81 H 5.90 N 9.83 Gef. C 62.05 H 5.93 N 9.54

16. *Glycyl-phenylalanyl-alanin (I) und (II)*: 0.458 g *Carbobenzoxy-tripeptid (I bzw. II)* in wäßrigem Dioxan wurden durch übliche Hydrierung in die freien Peptide übergeführt. Farblose Kristalle aus Wasser/Alkohol. Ausb.:

Tripeptid I: 0.28 g (86 % d. Th.), *Tripeptid II*: 0.27 g (84 % d. Th.).

17. *Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin-methylester*: *Methode B*: 4.81 g *Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-alanin-methylester* in 250 ccm Methanol wurden in Gegenwart von 1.25 ccm 10 *n* HCl katalytisch entacyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurde der erhaltene Rückstand (rohes Peptidester-hydrochlorid) in Dioxan suspendiert; nach Zugabe von 1.7 ccm *N*-Äthylpiperidin wurde die erhaltene Lösung zu der des gemischten Anhydrids aus 2.51 g *Carbobenzoxy-glycin* + 1.7 ccm *N*-Äthylpiperidin + 1.15 ccm Chlorameisensäure-äthylester in 50 ccm Tetrahydrofuran bei -5° gegeben, kurz zum beginnenden Sieden erhitzt und rasch wieder abgekühlt. Nach Zugabe von Kaliumhydrogencarbonat-Lösung im Überschub wurde mit Essigester extrahiert. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisierte der *Carbobenzoxy-tripeptidester* aus Essigester/Petroläther: Schmp. 124–125°. Ausb. 3.9 g (73 % d. Th.).

$C_{23}H_{27}N_3O_6$ (441.5) Ber. N 9.52 Gef. N 9.60

18. *Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin*: 3.0 g *Carbobenzoxyester* wurden, wie unter 15. beschrieben, mit 6.85 ccm *n* NaOH verseift und aufgearbeitet. Farblose Kristalle aus Essigester/Petroläther. Schmp. 165–166°. Ausb. 2.7 g (93 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $-8.6 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Methanol).

$C_{22}H_{25}N_3O_6$ (427.4) Ber. N 9.83 Gef. N 9.83

19. *Glycyl-L-phenylalanyl-L-alanin (III)*: 1.07 g *Carbobenzoxy-tripeptid* wurden wie üblich in das freie Tripeptid übergeführt. Feinste Nadelchen aus Wasser/Alkohol. Ausb. 0.65 g (88 % d. Th.). Zur Analyse und Drehwertsbestimmung wurde i. Hochvak. zur Gewichtskonstanz getrocknet. $[\alpha]_D^{20}$: $-5.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; *n* HCl).

$C_{14}H_{19}N_3O_4$ (293.3) Ber. C 57.32 H 6.53 N 14.33 Gef. C 57.13 H 6.80 N 14.24

Durchführung der enzymatischen Versuche: 0.05 mMol (21.4 mg) des jeweiligen *Carbobenzoxy-tripeptids (I, II bzw. III)* wurden in 0.5 ccm 0.1 *n* NaOH gelöst und mit Veronalpuffer (0.05 *m*; $p_H = 7.4$) auf 2 ccm aufgefüllt. Die Hälfte dieser Lösung wurde für die Blindwertbestimmung abpipettiert. Das Enzym wurde als wäßrige Suspension aufbewahrt und zum Gebrauch in 10-proz. Lithiumchlorid-Lösung gelöst. Die Abbauprobe wurde mit so viel Enzymlösung versetzt, daß das Verhältnis Substrat zu Enzym (S/E) 50:1 betrug.

Die Reaktionslösung wurde im Thermostaten bei 37° belassen. In gewissen Zeitabständen (s. die Abbild.) wurden Proben von 0.01 ccm entnommen (0.25 μ Mol Substrat) und in 2.5 cm

Breite strichförmig auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) aufgetragen. Zur Unterbrechung der Enzymeinwirkung wurde mit dem Fön scharf getrocknet oder im Trockenschrank kurze Zeit bei 100° aufbewahrt. Als Vergleichslösung wurde die von je 0.25 μ Mol Alanin und Phenylalanin aufgetragen. Chromatographiert wurde aufsteigend in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5). Nach dem Trocknen der Bögen im Exhaustor-Trockenschrank bei ca. 40° wurde nach der von W. GRASSMANN und Mitarbb.¹⁵⁾ beschriebenen Methode ausgewertet. In horizontaler Lage wurden die Bögen mit dem von J. BRÜGGEMANN und K. DREPPER¹⁶⁾ beschriebenen Ninhydrinreagenz besprüht, luftgetrocknet und schließlich im wasserdampfgesättigten Trockenschrank 3 Min. bei 100–105° belassen.

Die Chromatogramme wurden entsprechend der Auftragsstelle in 4 cm breite Streifen geschnitten, mit Transparentöl (Bromnaphthalin-Paraffinöl nach W. GRASSMANN und K. HANNIG¹⁷⁾) i. Vak. durchtränkt und im automatischen Extinktionsschreiber der Firma Zeiss bei 570 $m\mu$ kolorimetrisch ausgewertet. Die Gauß-Kurven wurden planimetriert und, auf die Testmischung bezogen, der prozentuelle Abbau zur Zeit der Probeentnahme berechnet (vgl. die Abbild.).

¹⁵⁾ W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. PLÖCKL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **299**, 258 [1955].

¹⁶⁾ Naturwissenschaften **39**, 301 [1952].

¹⁷⁾ Naturwissenschaften **38**, 200 [1951].

WOLFGANG GRASSMANN und ERICH WÜNSCH*)

Beiträge zur Peptidsynthese, III¹⁾

Zur Darstellung von Carbobenzoxy-aminosäuren

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

(Eingegangen am 14. Dezember 1957)

Es wird die Darstellung der kristallisierten Carbobenzoxy-Verbindungen von L-Prolin, L-Hydroxyprolin und DL-Leucin beschrieben; die Literaturangaben für Carbobenzoxy-L-valin und -L-phenylalanin bezüglich Schmelzpunkt und Drehwert werden berichtet.

Trotz der hohen Bedeutung für die Peptidsynthese blieben die Carbobenzoxy-Derivate einzelner wichtiger Aminosäuren in kristallisierter Form lange unbekannt. Im Zusammenhang mit peptidsynthetischen Arbeiten haben wir einige Carbobenzoxy-aminosäuren in kristallisierter Form gewonnen, darunter die von L-Prolin und L-Hydroxyprolin, über deren Herstellung inzwischen auch von zwei anderen Seiten berichtet wurde^{2, 3)}. Auch Carbobenzoxy-DL-leucin konnte auf dem im experimentellen

*) Dissertat., Univ. München 1955.

¹⁾ II. Mitteil.: W. GRASSMANN, E. WÜNSCH und A. RIEDEL, Chem. Ber. **91**, 455 [1958], vorstehend.

²⁾ A. BERGER, O. KURTZ und E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5552 [1954].

³⁾ A. A. PATCHETT und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. **79**, 185 [1957].