

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].

Teil angegebenen Wege kristallin gewonnen werden; dagegen schlugen bislang alle Kristallisationsversuche am Carbobenzoxy-L-leucin fehl.

Die Darstellung und Eigenschaften von *Carbobenzoxy-L-valin* sind bereits früher von A. L. M. SYNGE⁴⁾ bzw. J. R. VAUGHAN⁵⁾ beschrieben worden. Aus diesen Mitteilungen ergeben sich jedoch stark schwankende Angaben über Schmelzpunkt und Drehwert der Verbindung (vgl. Tab. 1).

Tab. 1. Daten der dargestellten Carbobenzoxy-aminosäuren

Derivat	Ausb. %	Schmp. °C		[α] _D ²⁰ (c = 2; Alkohol)	
		gef.	Lit.	gef.	Lit.
Z-Val-OH-(L)	87	66–67	65 59–61	+ 0.1 *)	+ 4.0 ⁴⁾ ± 0 ⁵⁾
Z-Leu-OH-(DL)	87	52–55	Öl		
Z-Phe-OH-(L)	83	88–89	126–128 130–132	+ 5.1 **)	+ 4.9 ***) 6) + 4.9 ***) 7)
Z-Pro-OH-(L)	95	77	76–77	–40.6 –60.5 **)	–61.7 ***) 2)
Z-Hypro-OH-(L)	88	106	106–107	–53.8	–72.0 §) 3)

*) c = 10. **) In Eisessig. §) In Chloroform.

Unter Einhaltung der im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen konnten wir die Verbindung in farblosen Spießen mit ausgezeichneter Ausbeute erhalten. Der Schmelzpunkt lag etwas höher als derjenige des Präparates von SYNGE, während der ermittelte Drehwert dagegen den Angaben von VAUGHAN entsprach.

Eine Überraschung brachte die Synthese des *Carbobenzoxy-L-phenylalanins* nach BERGMANN und Mitarbb.⁶⁾ Das beim *vorsichtigen* Ansäuern ausfallende, in Essigester nicht besonders lösliche Produkt besaß einen Schmelzpunkt von 132° (nach BERGMANN 126–128°, nach VAUGHAN⁷⁾ 130–132°) sowie den in der Literatur genannten Drehwert in Eisessig. Eine fraktionierte Kristallisation aus Essigester lieferte eine Verbindung (I) vom Schmp. 143–144°, Neutral-Äquivalent gefunden 385 statt berechnet 299; der Veraschungsrückstand reagierte stark alkalisch. Die katalytische Hydrierung lieferte L-Phenylalanin von einwandfreier optischer Reinheit. Die aus der Mutterlauge erhaltene zweite Fraktion (II) vom Schmp. 88–89° brachte das gewünschte Äquivalentgewicht von 299 und einwandfreie Analysendaten; sie ließ sich mit etwas besserer Ausbeute als I in reines L-Phenylalanin überführen.

Die beim *kräftigen* Ansäuern des Reaktionsgemisches mit einem *Überschuß* an Salzsäure ausfallende Substanz — der zuerst sich bildende kristalline Niederschlag, der den ganzen Kolbeninhalt erstarren ließ, ging dabei in ein halbfestes Produkt über — löste sich dagegen spielend in Essigester: nach üblichem Aufarbeiten wurde stets ein Carbobenzoxy-L-phenylalanin vom Schmp. 88–89° erhalten. Auf Grund des gefundenen Äquivalentgewichtes wie der Analysendaten handelt es sich bei der Verbindung I offenbar um eine Additions- oder allenfalls Einschlußverbindung von Carbobenzoxy-L-phenylalanin und dessen Natriumsalz im annähernden Verhältnis 4:1.

4) Biochem. J. **42**, 99 [1948].

5) J. R. VAUGHAN JR. und J. A. EICHLER, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5556 [1953].

6) M. BERGMANN, L. ZERVAS, H. RINKE und H. SCHLEICH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 33 [1934].

7) J. R. VAUGHAN JR., J. Amer. chem. Soc. **74**, 6137 [1952].

Eine Zusammenstellung der Schmelzpunkte von Carbobenzoxy-Verbindungen zeigt, daß die DL-Verbindungen *ausnahmslos höher* schmelzen als die L-Derivate und daß der Schmelzpunkt in der homologen Reihe von Glycin nach Leucin abfällt (Tab. 2). Der Schmelzpunkt des bislang nur als Öl erhaltenen Carbobenzoxy-L-leucins dürfte daher sehr tief liegen.

Tab. 2. Vergleich der Schmelzpunkte von DL- und L-Carbobenzoxy-aminosäuren

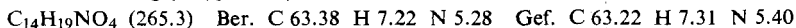
Derivat	DL-Verb.	Schmp. °C L-Verb.
Z-Gly-OH	120 ⁸⁾	—
Z-Ala-OH	114—115 ⁸⁾	84—86 ⁹⁾
Z-Val-OH	72—73 ¹⁰⁾	66—67
Z-Leu-OH	70—71 ¹¹⁾	Öl
Z-Isoleu-OH	52—55	Öl
Z-Phe-OH	108 ⁹⁾	88—89
Z-Ser-OH	103 ⁸⁾	121 ¹²⁾
Z-Met-OH	125 ⁸⁾	68—69 ¹⁴⁾
Z-Try-OH	110—112 ⁹⁾	67—68 ¹⁵⁾
	112 ¹³⁾	126 ¹⁶⁾
	169—170 ¹⁶⁾	

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Carbobenzoxy-L-valin*: 11.7 g *L-Valin* wurden in 50 ccm 2*n* NaOH gelöst und unter Eiskühlung und kräftigem Schütteln portionsweise mit 17 g reinstem *Carbobenzoxy-chlorid* und 25 ccm 4*n* NaOH innerhalb von 30 Min. gekuppelt. Das beim Ansäuern (Kongorot) ausfallende Öl löste sich leicht in Essigester. Nach Säurefreiwaschen wurde die Carbobenzoxy-Verbindung mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert und nach Ansäuern in frischen Essigester übergeführt. Die übliche Aufarbeitung ergab ein fast farbloses Öl, das beim Aufbewahren im Vakuumexsikkator über P₂O₅ nach einiger Zeit (sofort nach Animpfen) erstarrte. Lange Spieße aus Essigester/Petroläther; Schmp. 66—67°. Ausb. 20.6—21.8 g (82—87 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: +0.1 ± 0.1° (*c* = 10; Alkohol).

Zur Prüfung der optischen Reinheit wurden 2.5 g Carbobenzoxy-L-valin hydrogenolytisch entacyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurde chromatographisch reines *L-Valin* nach Umkrist. aus Wasser/Alkohol erhalten: Ausb. 1.05 g (90% d.Th.); $[\alpha]_D^{20}$: +27.4 ± 0.5° (*c* = 2; 5*n* HCl).

2. *Carbobenzoxy-DL-leucin*: Aus 19.6 g *DL-Leucin* in 75 ccm 2*n* NaOH, 25.5 g *Carbobenzoxy-chlorid* und 90 ccm 2*n* NaOH. Der erhaltene Sirup kristallisierte nach wochenlangem Aufbewahren; durch mehrmaliges Verreiben wurde der Prozeß beschleunigt. Aus warmem Essigester kristallisierte die Verbindung nach vorsichtigem Zusatz von Petroläther: Schmp. 52—55°. Ausb. 34.5 g (87 % d. Th.).



⁸⁾ M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

⁹⁾ A. WINTERSTEIN, B. HEGEDÜS, B. FUST, E. BÖHNI und A. STUDER, Helv. chim. Acta **39**, 229 [1956].

¹⁰⁾ J. W. HINMAN, E. L. CARON und H. N. CHRISTENSEN, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1620 [1950].

¹¹⁾ M. J. W. DAVIS, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **234**, 1183 [1952].

¹²⁾ J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **146**, 463 [1942].

¹³⁾ C. A. DEKKER und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **173**, 471 [1948].

¹⁴⁾ M. BRENNER und R. W. PFISTER, Helv. chim. Acta **34**, 2085 [1951].

¹⁵⁾ K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER und H. KAPPELER, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1636 [1957].

¹⁶⁾ E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **175**, 39 [1948].

3. *Carbobenzoxy-L-prolin*: Aus 15 g *L-Prolin* in 32.5 ccm 4*n* NaOH und 19.6 ccm *Carbobenzoxy-chlorid* + 33.8 ccm 4*n* NaOH. Farbloser Sirup, der, im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet, bei mehrmaligem Verreiben mit trockenem Petroläther schließlich kristallisierte (sofort nach Animpfen). Schmp. 73–75°. Aus Essigester/Petroläther farblose Bipyramiden vom Schmp. 77°. $[\alpha]_D^{20}$: $-60.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Eisessig); $[\alpha]_D^{20}$: $-40.6 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Alkohol). Ausb. 29–30.6 g (90–95 % d. Th.).

C₁₃H₁₅NO₄ (249.3) Ber. C 62.64 H 6.06 N 5.62 Gef. C 62.4 H 6.06 N 5.52

2.5 g *Carbobenzoxy-L-prolin* in Eisessig wurden wie üblich entacyliert: *L-Prolin*. Ausb. 1.01 g (88 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $-83.4 \pm 1^\circ$ ($c = 2$; H₂O).

4. *Carbobenzoxy-L-hydroxyprolin*: Aus 7.86 g *L-Hydroxyprolin* in 30 ccm 2*n* NaOH und 10.23 g *Carbobenzoxy-chlorid* + 15 ccm 4*n* NaOH^{*)}. Das erhaltene farblose Öl kristallisierte bei längerem Stehenlassen. Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther: Schmp. 106°; $[\alpha]_D^{20}$: $-53.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Alkohol); Ausb. 13.5–14 g (84–88 % d. Th.).

C₁₃H₁₅NO₅ (265.3) Ber. C 58.87 H 5.70 N 5.28 O 30.16
Gef. C 59.17 H 5.80 N 5.51 O 29.9

2.65 g *Carbobenzoxy-Derivat* in wäßrigem Methanol wurden wie üblich in freies *L-Hydroxyprolin* übergeführt. Ausb. 1.1 g (84 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $-75.7 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; H₂O).

5a) *Carbobenzoxy-L-phenylalanin*: Aus 10 g *L-Phenylalanin* in 30 ccm 2*n* NaOH und 9 ccm *Carbobenzoxy-chlorid* + 31 ccm 2*n* NaOH, wie unter 1. beschrieben. Nach Zugabe der vierten Portion *Carbobenzoxy-chlorid* fiel ein kristallines Produkt aus; es wurde mit Wasser in Lösung gebracht und die Kupplung fortgesetzt. Unter kräftigem Rühren wurde mit 32 ccm 2*n* HCl angesäuert, das ausgefallene Produkt in Essigester aufgenommen. Nach Waschen der organischen Phase mit 0.5*n* HCl wurde schließlich nach den unter 1. geschilderten Bedingungen aufgearbeitet. Farblose Nadeln aus Essigester/Petroläther: Schmp. 88–89°; $[\alpha]_D^{20}$: $+5.1 \pm 0.2^\circ$ ($c = 5$; Eisessig). Ausb. 15 g (83 % d. Th.).

C₁₇H₁₇NO₄ (299.3) Ber. C 68.20 H 5.74 N 4.68 Äquiv.-Gew. 299.3
Gef. C 68.20 H 5.75 N 4.82 Äquiv.-Gew. 299

2 g *Carbobenzoxy-L-phenylalanin* in verd. Methanol wurden wie üblich entacyliert und aufgearbeitet: *L-Phenylalanin*. Ausb. 0.95 g (86 % d. Th.); $[\alpha]_D^{20}$: $-34.4 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; H₂O).

5b) 10 g *L-Phenylalanin* wurden, wie unter a) beschrieben, carbobenzoxyliert, das Reaktionsgemisch aber nur mit 30 ccm 2*n* HCl (1 Äquiv.) vorsichtig versetzt. Die kristalline Fällung wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet. Schmp. 132°. Das Produkt löste sich in siedendem Essigester und fiel beim Erkalten in schönen Kristallen wieder aus (Fraktion I). Schmp. 143–144°. $[\alpha]_D^{20}$: $+4.9 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; Eisessig). Ausb. 8 g.

(C₁₇H₁₇NO₄)₅ + Na Neutraläquiv.: Ber. 397.9, gef. 385
Na: Ber. 1.53, gef. 1.57

2 g der Verbindung wurden wie üblich katalytisch entacyliert und aufgearbeitet: *L-Phenylalanin*. $[\alpha]_D^{20}$: $-34.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$; H₂O). Ausb. 0.8 g.

Aus der Mutterlauge der Essigesterfällung der Fraktion I konnte nach Eindampfen i. Vak. und Umkristallisieren des Rückstandes aus Essigester/Petroläther eine weitere Fraktion erhalten werden. Schmp. 88–89°. Ausb. 6.2 g.

*) Wegen der Löslichkeit des *Carbobenzoxy-Derivates* in Wasser war es erforderlich, alle wäßrigen, zur Extraktion mit Essigester vorgesehenen Phasen sowie die Waschwässer mit Natriumchlorid zu sättigen.