

Bei Verseifung mit alkohol. Kalilauge erfolgte Bildung der blaufluoreszierenden Harman-carbonsäure-(3) (III).  $R_F$ -Wert 0,25, Laufmittel 5-proz. Ammoniak.

Eine qualitative Auswertung des UV-Spektrums des Esters ergab Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Harmanspektrum<sup>21)</sup>.  $\lambda_{\max} = 236 \text{ m}\mu$ ,  $270 \text{ m}\mu$ ; kleinere Maxima  $\lambda_{\max} = 331 \text{ m}\mu$ ,  $345 \text{ m}\mu$ .

Zum Vergleich wurde die Ausmessung des Harmanspektrums in Methanol wiederholt und die genaue Lage der Maxima bestimmt:  $\lambda_{\max} = 212 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 4.287$ ;  $234 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 4.535$ ;  $287.5 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 4.171$ ;  $335 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 3.607$ ;  $348.5 \text{ m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 3.620$  (Methanol,  $c = 0.0142$  bzw.  $0.0071 \text{ g/l}$ ).

<sup>21)</sup> H. SCHMID, A. EBNÖTHER und P. KARRER, *Helv. chim. Acta* **33**, 1488 [1950].

## EUGEN BAMANN, HEINZ TRAPMANN und ANA ROTHER

### Über die Hydrolyse von Dipeptiden in Anwesenheit von Lanthan-, Cer(III)- und Cer(IV)-Ionen

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

(Eingegangen am 13. Mai 1958)

Die Peptidbindung in Dipeptiden wird in Anwesenheit geeigneter Metallionen gelöst. — Der metallionenkatalytischen Spaltung liegt die Bildung eines zerfallsfähigen Reaktionszwischenproduktes durch koordinative Bindung des Katalysators an die freien Elektronenpaare des Amino- und des Carbonamid-Stickstoffes des Dipeptids zugrunde. — Die „peptidatische“ Wirksamkeit der Katalysatoren nimmt in der Reihenfolge  $\text{Ce}^{4\oplus} \rightarrow \text{Ce}^{3\oplus} \rightarrow \text{La}^{3\oplus}$  ab. — Für die geprüften Dipeptide ergibt sich eine Stabilitätsreihe, ähnlich wie sie früher bei der enzymatischen Spaltung und neuerdings bei der Hydrolyse mittels Ionenaustauscher gefunden worden ist.

Die C—N-Bindung in Dipeptiden wird im schwach alkalischen Milieu und bei niederen Temperaturen ( $37^\circ$ ) in Anwesenheit von Cer(III)- sowie von Cer(IV)-Ionen gelöst. Bei Lanthan tritt diese „peptidatische“ Aktivität im allgemeinen erst bei etwas höheren Temperaturen ( $70^\circ$ ) in Erscheinung<sup>1)</sup>. Die Hydrolyse erfolgt weitaus am raschesten in Gegenwart von Cer(IV)-Ionen, sehr gut in Anwesenheit von Cer(III)-Salzen, weniger gut unter Mitwirkung von Lanthanionen.

Das *Reaktionszwischenprodukt* dieser Katalyse könnte so entstehen, daß sich Lanthan- bzw. Cer(III)- bzw. Cer(IV)-Ionen mit dem Dipeptid über die Carboxylgruppe in Form einfacher Salze vereinigen: Das zerfallende Zwischenprodukt würde sich danach bei den drei Katalysatoren nach gleicher Art durch Anlagerung an die Carboxylgruppe bilden und die den Umsatz bedingenden Faktoren (Affinität und

<sup>1)</sup> E. BAMANN, A. ROTHER und H. TRAPMANN, *Naturwissenschaften* **43**, 326 [1956].

Zerfallsgeschwindigkeit) wären dann bei der Cer(IV)-Zwischenverbindung einzeln oder gemeinsam bedeutend größer als im Falle der Cer(III)- oder der Lanthan-Katalyse. Experimentelle Befunde legen aber nahe, für die Cer(IV)-Katalyse einen anderen Reaktionsmechanismus anzunehmen:

Bei der Reaktion zwischen Cer(IV)-Salz und Dipeptid wird die freie Carboxylgruppe des Dipeptids nicht an das Metallion gebunden; sie ist nämlich bei der Titration in alkoholischem Milieu<sup>2)</sup> schon bei Beginn der Reaktion zu erfassen, liegt also in freier Form vor. Die Verknüpfung des Cer(IV)-Salzes mit dem Dipeptid wird daher durch koordinative Bindung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome erfolgen, d. h. mit je einem Elektronenpaar der Amino- und der Carbonamid-Gruppierung. Bei der Reaktion zwischen Lanthan- bzw. Cer(III)-Ionen und dem Dipeptid wird die Carboxylgruppe im Null-Wert nicht erfaßt, sie ist also hier an der Bindung des Peptids an die Metallionen beteiligt; jedoch unterscheiden sich diese beiden Metallionen hinsichtlich ihrer Auswirkung: Der Umsatz der Cer(III)-Peptid-Verbindung ist bei der von uns gewählten Substratkonzentration wesentlich größer als derjenige der Lanthan-Verbindung. Außerdem beobachtet man bei der Verwendung von Cer(III) als Katalysator schon nach sehr kurzen Versuchszeiten die Entstehung der freien Carboxylgruppe; mit Lanthan tritt diese Erscheinung erst nach längerer Versuchszeit und ausschließlich bei höherer Temperatur auf.

Zunächst *überrascht* die viel stärkere Wirkung des *Cer(IV)*: Auf Grund der weit geringeren Basizität dieses Ions vollzieht sich nämlich schon ab  $p_H$  2.65 die Ausfällung als Hydroxyd, während dies bei Cer(III) erst bei  $p_H$  5.68 und bei Lanthan bei  $p_H$  6.6 der Fall ist<sup>3)</sup>. Man könnte daraus folgern, daß die Cer(IV)-Ionen in unserem Versuchsmilieu ( $p_H$  8) weit mehr der katalytischen Reaktion entzogen würden als die Cer(III)- und die Lanthan-Ionen. Mit anderen Worten: Die Tendenz des Cer(IV)-Ions zur Bildung von Cer(IV)-hydroxyd ist weitaus größer als sein Anlagerungsvermögen an die Carboxylgruppe des Dipeptids. Wenn trotzdem stärkste katalytische Effekte auftreten, so scheint es uns nur durch die vorstehend erwähnte experimentell gestützte Annahme möglich, daß eine koordinative Bindung des Cer(IV)-hydroxyds an das Dipeptid zum Reaktionszwischenprodukt führt.

Der *Cer(III)*-Katalyse dürfte dann folgender Vorgang zugrunde liegen: Durch Reaktion des  $Ce(OH)^{2\oplus 4)}$  mit dem Dipeptid entsteht primär unter Miteinbeziehung der Carboxylgruppe ein salzartiges Zwischenprodukt, dessen hohe Labilität durch den Übergang des Cer(III)-Ions in den vierwertigen\*) Zustand erklärt werden könnte. Dadurch käme es auch mit diesem Katalysator letzten Endes zur Bildung eines nur koordinativ gebundenen Reaktionszwischenproduktes.

Ob bei *Lanthan* mit der, wie schon erwähnt, stärksten Bindung der Peptid-Carboxylgruppe an das  $La(OH)^{2\oplus}$ -Ion eine ähnliche Umbildung in das eigentlich aktive Zwischenprodukt, in dem die Carboxylgruppe in freier, dissoziierter Form vorläge,

<sup>2)</sup> R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2988 [1921].

<sup>3)</sup> R. C. VICKERY, Chemistry of the Lanthanons, S. 213, Butterworth Sci. Publ., London 1953.

<sup>4)</sup> Im schwach alkalischen Milieu ( $p_H$  8–8.6) liegen die Cer(III)- und Lanthan-Salze als basische Salze vor<sup>3)</sup>.

\*) Unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs: siehe dazu u. a. l. c.<sup>3)</sup>, S. 214 ff.

als Voraussetzung für den Zerfall des Zwischenproduktes anzunehmen ist oder ob schon das Primärprodukt für den langsamen Zerfall in Frage kommt, ist experimentell noch nicht geklärt.

Von großer Bedeutung für die Auslösung der metallionenkatalytischen Spaltung des Dipeptids erscheint uns die Anwesenheit des freien Carboxylat-Ions. Durch seinen schwach positivierenden F-Effekt bewirkt es eine partielle Polarisierung des Moleküls, welche die Stabilität der C—N-Bindung noch weiter verringern dürfte.

Die abgestufte Wirksamkeit der Katalysatoren  $Ce^{4\oplus} \rightarrow Ce^{3\oplus} \rightarrow La^{3\oplus}$  hat ihren Grund folglich darin, daß bei Cer(IV) in der vorausgehend beschriebenen Art *soft* eine Anlagerung des Hydroxyds zu einem Zwischenprodukt erfolgt, in dem größte Labilität der Peptidbindung vorliegt. Bei Cer(III) findet ein Übergang statt: Hier liegt zunächst Salzbildung mit gebundener Carboxylgruppe vor, die aber durch Übergang des Cers von der dreiwertigen in die vierwertige Stufe frei wird, wobei gleichzeitig eine Anlagerung des Cer(IV) in Form seines Hydroxyds erfolgt. Bei Lanthan endlich ist entweder der sehr langsam erfolgende Übergang des Primärproduktes in das aktive Zwischenprodukt die limitierende Reaktion, oder es unterliegt bereits das Primärprodukt dem Zerfall, allerdings einem sehr langsamen.

Die peptidatischen Eigenschaften stützen sich also auf folgende Tatsachen:

1. Bildung eines zerfallsfähigen Reaktionszwischenproduktes durch Anlagerung des Katalysators an die freien Elektronenpaare des Amino- und Carbonamid-Stickstoffes des Dipeptids.
2. Spaltung der Peptidbindung, bedingt durch
  - a) Verminderung der Stabilität der Peptidbindung infolge koordinativer Bindung des freien Elektronenpaares der Carbonamidgruppe,
  - b) induktive Wirkung des Carboxylat-Ions sowie
  - c) die Tatsache, daß die Verbindung eines Metallions bzw. -hydroxyds mit einem Elektronenspender (in unserem Fall dem Peptid) eine Verminderung der negativen Ladung seines Spenders zur Folge hat.

Zu der Frage, worin man die Ursache für die Lösung der Peptidbindung bei der *enzymatischen* Katalyse sehen könnte, äußern sich A. E. MARTELL und M. CALVIN<sup>5)</sup>. Die Autoren nehmen an, daß durch die koordinative Bindung des freien Elektronenpaares des Peptid-Stickstoffes mit dem Metallion des Enzyms die stabilisierende Carbonamid-Mesomerie beeinträchtigt wird. Dies verursacht eine Positivierung des Carbonyl-Kohlenstoffes und somit eine erhöhte Reaktionsfähigkeit gegenüber Wassermolekülen oder Hydroxylionen. Diese Fähigkeit, mit Basen zu reagieren, wird weiterhin durch die saure Natur des an das Peptid gebundenen Metallions erhöht.

Nach den dargelegten Auffassungen wird man der *metallionenkatalytischen* und *enzymatischen* Peptidhydrolyse im wesentlichen gleiche Vorgänge zugrunde legen dürfen.

Der *Spaltungsverlauf* der untersuchten Peptide ist aus den in der Tab. (S. 1750) zusammengestellten, auf chromatographischem Wege gewonnenen Versuchsergebnissen ersichtlich. Daraus ist hervorzuheben:

<sup>5)</sup> Chemistry of the Metal Chelate Compounds, Prentice-Hall, New York 1953, S. 407.

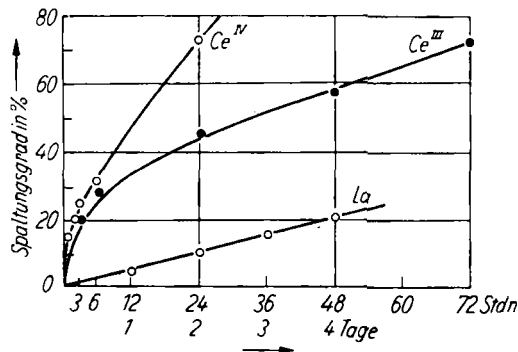
1. Der Beweis für eine Spaltung der Peptide unter dem Einfluß der seltenen Erdmetallionen ergibt sich durch Gegenüberstellung der angefärbten Chromatogramme von Versuchen mit und ohne Zusatz von Metallionen. Dabei wird ersichtlich, daß die Konzentration der entstehenden Spaltungsprodukte mit zunehmenden Versuchszeiten sowie durch Erhöhung der Versuchstemperatur wächst<sup>6)</sup>. Ohne Anwesenheit von Katalysatoren erweisen sich die meisten Peptide selbst nach längeren Versuchszeiten bei 37° und bei 70° als beständig; nur Glycyl-alanin und Alanyl-glycin erleiden bei 70° nach etwa 72 Stdn. schwache Spaltung.

2. Gegenüber allen untersuchten Dipeptiden sind die Ionen des 4-wertigen Cers katalytisch am wirksamsten. Auch Cer(III)-Ionen sind gut wirksam. Der Lanthan-Einfluß ist am geringsten, er tritt bei einigen Substraten (Glycyl-leucin, Glycyl-phenylalanin, Glycyl-tyrosin) erst bei höheren Versuchstemperaturen (70°) in Erscheinung.

3. Die Peptide Glycyl-glycin, Glycyl-alanin und Alanyl-glycin zeigen (in Versuchen mit dem katalytisch am wenigsten wirksamen Lanthan) die größte Labilität.

4. Die Hydrolysebilder des Glycyl-alanins und des Alanyl-glycins lassen keinen merklichen Unterschied erkennen. Die Art der Verknüpfung der Aminosäuren ist demnach — wenigstens in diesem Fall — nicht von Bedeutung.

Ein Bild der Hydrolyse des Glycyl-L-leucins durch Lanthan-, Cer(III)- und Cer(IV)-Salz gibt auch die Abbild., deren Ergebnisse mittels der von W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. PLÖCKL<sup>7)</sup> angegebenen Methode ermittelt sind und als angenähert quantitativ gelten können.



Hydrolyse des Glycyl-L-leucins durch Lanthan-, Cer(III)- und Cer(IV)-Salz.  
Zeit für Ce<sup>IV</sup> und Ce<sup>III</sup> in Stdn., für La in Tagen.

(Der Vers.-Ansatz von 5ccm enthält 0.0001 Mol Peptid, 0.0001 Mol La- bzw. Ce<sup>III</sup>- bzw. Ce<sup>IV</sup>-Salz, 1ccm 2.5*n* Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer, *pH* 8.6; *t* = 70°; Zugabefolge B.)

Danach wird 10-proz. Spaltung erreicht: mit Cer(IV) in 30 Min., mit Cer(III) in 60 Min., mit Lanthan in 48 Stdn.

<sup>6)</sup> Im Falle des Glycyl-tyrosins ist bei 70° nach 72 Stdn. eine Zersetzung des Substrates zu beobachten, welche die weitere Verfolgung des Spaltungsverlaufes verhindert.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299, 258 [1955].

Das  $p_H$ -Optimum der metallionenkatalytischen Spaltung dürfte zwischen  $p_H$  8 und  $p_H$  8.6 liegen. Bei  $p_H$  9.5 ist zwar die Hydrolyse viel stärker; hier tritt aber zu der metallionenkatalytischen Wirkung diejenige der Hydroxylionen; bei dieser Wasserstoffionenkonzentration ist nämlich die Anwesenheit freier Aminosäuren schon nach relativ kurzen Versuchszeiten auch ohne Anwesenheit eines Metallionenkatalysators zu beobachten. In schwach saurem Milieu ( $p_H$  5) ist die Metallionenkatalyse bedeutend schwächer.

Über die saure und alkalische Hydrolyse von Peptiden haben schon früher verschiedene Autoren berichtet<sup>8-13)</sup>. Insbesondere E. ABDERHALDEN und Mitarbb. sowie P. A. LEVENE und seine Schule haben sich mit diesem Problem beschäftigt. Diese Autoren finden übereinstimmend folgende Sequenz abnehmender Hydrolysegeschwindigkeit der Glycyl-amino-säuren: Glycyl-glycin, -alanin, -leucin, -phenylalanin, -valin. P. A. LEVENE<sup>12)</sup> hat eine Klassifikation nach wachsendem Stabilisierungseffekt der Seitenkette angegeben.

Auch bei der neuerdings durchgeführten Hydrolyse von Proteinen und Peptiden mittels Ionenaustauscher, insbesondere durch Dowex 50<sup>14,15)</sup>, ist diese Stabilitätsreihe von neuem gefunden worden. Sie hat nach unseren Befunden auch bei der metallionenkatalytischen Spaltung Gültigkeit.

Auf Grund der erweiterten Erfahrungen ergibt sich: Die Stabilität der Peptidbindung im Glycyl-glycin wird durch den Eintritt eines Restes verstärkt. Diese stabilisierende Wirkung ist größer, wenn der Substituent am Amino-Ende des Peptids eintritt. Noch mehr wird die Peptidbindung stabilisiert durch Einführung zweier gleichartiger Substituenten, und zwar am stärksten, wenn sie beide an das gleiche Kohlenstoffatom gebunden sind, anstatt sich auf beide Methylengruppen der Kette zu verteilen. Voraussichtlich liegen hier ähnliche Verhältnisse vor, wie sie E. BAMANN und W.-D. MÜTTERLEIN<sup>16)</sup> bei der metallionenkatalytischen Verseifung von aliphatischen Phosphorsäureestern gefunden haben, wo die verschieden starke elektronen-abstoßende Wirkung der aliphatischen Reste die Stabilität mitbestimmt.

Auch über den *rascheren Verlauf* der *alkalischen* im Vergleich zur *sauren* Peptidhydrolyse sind bereits Überlegungen angestellt worden. G. CARPÉNI und J. CHOUTEAU<sup>13)</sup> nehmen an, daß in einem neutralen oder sauren Milieu die Peptide durch Anlagerung von Wassermolekülen in cyclisierten Formen vorliegen und somit gegen die Einwirkung der H-Ionen geschützt sind. Im alkalischen Milieu hingegen liegt die Peptidkette offen vor und ist wesentlich stärker dem hydrolysierenden Einfluß der OH-Ionen ausgesetzt.

8) M. LÜDTKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **141**, 100 [1924].

9) J. S. JAITSCHNIKOW, J. russ. physik.-chem. Ges. **58**, 1373 [1926]; C. **1927** II, 1143.

10) E. ABDERHALDEN und H. MAHN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **169**, 196 [1927]; E. ABDERHALDEN und H. SICKEL, ebenda **170**, 134 [1927]; E. ABDERHALDEN und H. BROCKMANN, ebenda **170**, 146 [1927]; E. ABDERHALDEN und SH. SUZUKI, ebenda **170**, 158 [1927]; E. ABDERHALDEN und H. MAHN, ebenda **174**, 47 [1928].

11) P. A. LEVENE und R. E. STEIGER, J. biol. Chemistry **82**, 167 [1929].

12) P. A. LEVENE, E. R. STEIGER und A. ROTHEN, J. biol. Chemistry **97**, 717 [1932].

13) G. CARPÉNI und J. CHOUTEAU, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **236**, 1354 [1953]; J. Chim. physique Physico-Chim. biol. **50**, 267 [1953].

14) L. LAWRENCE und W. J. MOORE, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3973 [1951].

15) J. R. WHITAKER und F. E. DEATHERAGE, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3360 [1955].

16) Chem. Ber. **91**, 1322 [1958].

Zur *enzymatischen* Hydrolyse Vergleiche zu ziehen wird dadurch erschwert, daß die aus früheren Zeiten vorliegenden Befunde<sup>17)</sup> nur bedingte Vergleichsmöglichkeiten zulassen; Herkunft und Zustand des Enzyms, nicht zuletzt die natürliche oder zusätzliche Anwesenheit von Metallionen, deren Bedeutung erst ab etwa 1940 erkannt worden ist, bestimmen weitgehend dessen Aktivität und Spezifität<sup>18)</sup>.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Substrate*: *Glycyl-glycin*,  $C_4H_8N_2O_3$  (132.1), E. MERCK, Darmstadt, List. Nr. 4233. — *Glycyl-DL-alanin*,  $C_5H_{10}N_2O_3$  (146.1), LIGHT's Organic Chemicals. — *DL-Alanyl-glycin*,  $C_5H_{10}N_2O_3$  (146.1), LIGHT's Organic Chemicals. — *Glycyl-L-leucin*,  $C_8H_{16}N_2O_3$  (188.2), Dr. TH. SCHUCHARDT, München. — *Glycyl-DL-leucin*,  $C_8H_{16}N_2O_3$  (188.2), Dr. TH. SCHUCHARDT, München. — *L-Valyl-glycin*,  $C_7H_{14}N_2O_3$  (174.2), Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München\*). — *Glycyl-prolin*,  $C_7H_{12}N_2O_3$  (172.2), Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München\*). — *Glycyl-DL-phenylalanin*,  $C_{11}H_{14}N_2O_3$  (222.2), LIGHT's Organic Chemicals. — *Glycyl-tyrosin*,  $C_{11}H_{14}N_2O_4$  (238.2), Dr. TH. SCHUCHARDT, München.

2. *Metallsalze*:  $La(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$  p. a. E. MERCK (List. Nr. 5326);  $Ce(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$  E. MERCK (List. Nr. 2271);  $Ce(SO_4)_2 \cdot 4 H_2O$  E. MERCK (List. Nr. 2274).

3. *Der Versuchsansatz*: Das Reaktionsgemisch von 5 ccm enthält 1 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer, 0.0001 Mol Peptid, 0.0001 Mol Cer- bzw. Lanthan-Salz. Das Reaktionsmilieu wurde, wenn erforderlich, durch Zugabe weniger Tropfen von 2.5 n  $NH_3$  auf dem geforderten  $pH$ -Wert gehalten. Reaktionstemperatur: 37 bzw. 70°.

Die dem Reaktionsgemisch zum Auftragen auf das Chromatogrammpapier jeweils entnommenen Proben betragen in der Regel 0.03 ccm.

<sup>17)</sup> O. AMBROS und A. HARTENECK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **184**, 93 [1929]; H. v. EULER und K. JOSEPHSON, Ber. dtsh. chem. Ges. **59**, 226 [1926]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **157**, 122 [1926]; H. v. EULER und Z. KERTÉCZ, Ber. dtsh. chem. Ges. **61**, 1525 [1928]; H. v. EULER, S. MYRBÄCK und K. MYRBÄCK, ebenda **62**, 2194 [1929]; W. GRASSMANN und H. DYCKERHOFF, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **175**, 18 [1928]; P. A. LEVENE, L. W. BASS und R. E. STEIGER, J. biol. Chemistry **81**, 221 [1929]; P. A. LEVENE, H. S. SIMMS und M. H. PFALTZ, ebenda **70**, 253 [1926]; K. LINDERSTRÖM-LANG, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **182**, 151 [1929]; K. LINDERSTRÖM-LANG und M. SATO, ebenda **184**, 83 [1929]; J. H. NORTHROP und H. S. SIMMS, J. gen. Physiol. **12**, 313 [1928]; E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. HARTENECK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **147**, 286 [1925]; **149**, 203 [1925]; E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. SCHÄFFNER, ebenda **151**, 31 [1926]; E. WALDSCHMIDT-LEITZ und J. WALDSCHMIDT-GRASER, ebenda **166**, 247 [1927]; E. WALDSCHMIDT-LEITZ und G. v. SCHUCKMANN, ebenda **184**, 56 [1929].

<sup>18)</sup> E. ABDERHALDEN und G. EFFKEMANN, Fermentforschung **14** (N. F. 7), 27 [1933]; E. BAMANN und O. SCHIMKE, Biochem. Z. **308**, 130 [1941]; **310**, 119, 302 [1941/42]; G. A. FLEISCHER, J. biol. Chemistry **205**, 925 [1953]; J. CHOUTEAU und H. LENORMANT, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **232**, 1479 [1951]; A. GOUDOT, ebenda **235**, 1396 [1952]; **240**, 778 [1955]; E. MASCHMANN, Biochem. Z. **302**, 332 [1939]; **307**, 1 [1940/41]; **308**, 359 [1941]; **309**, 179 [1941]; **313**, 129 [1942/43]; **315**, 1 [1943]; Chemiker-Ztg. **67**, 280 [1943]; Naturwissenschaften **26**, 791 [1938]; **28**, 765, 780 [1940]; **29**, 691 [1941]; **31**, 136 [1943]; E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **176**, 9 [1948]; E. L. SMITH in J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, The Enzymes, Academic Press, New York 1950, Vol. I S. 819 und 831; G. H. WOLFF und S. FALLAB, Helv. chim. Acta **39**, 999 [1956].

\*) Diese Substrate verdanken wir dem großzügigen Entgegenkommen von Herrn Dr. E. WÜNSCH, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, das unter Leitung von Herrn Professor Dr. W. GRASSMANN steht.

Spaltung von Peptiden \*) durch seltene Erdmetalle. (Der Vers.-Ansatz von 5 ccm enthält 0.0001 Mol Substrat, 0.0001 Mol La- bzw. CeIII. bzw. CeIV-Salz, 1 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer, pH 8.6, Zugabefolge B.)

| Reakt.-<br>Dauer<br>in Stdn. | Glycyl-glycin |       |      | Glycyl-DL-alanin |       |      | DL-Alanyl-glycin |       |      | Glycyl-L-leucin |       |      |
|------------------------------|---------------|-------|------|------------------|-------|------|------------------|-------|------|-----------------|-------|------|
|                              | La            | CeIII | CeIV | La               | CeIII | CeIV | La               | CeIII | CeIV | La              | CeIII | CeIV |
| 0                            | -             | -     | -    | -                | -     | -    | -                | -     | -    | -               | -     | -    |
| 3                            | -             | +     | +    | -                | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    |
| 6                            | -             | +     | +    | -                | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    |
| 24                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 48                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 72                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 96                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 192                          | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 37°                          |               |       |      |                  |       |      |                  |       |      |                 |       |      |
| 0                            | -             | -     | -    | -                | -     | -    | -                | -     | -    | -               | -     | -    |
| 3                            | -             | +     | +    | -                | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    |
| 6                            | -             | +     | +    | -                | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    |
| 24                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 48                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 72                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 96                           | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 192                          | +             | +     | +    | +                | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    |
| 70°                          |               |       |      |                  |       |      |                  |       |      |                 |       |      |

| Reakt.-<br>Dauer<br>in Stdn. | Glycyl-DL-phenylalanin |       |      | Glycyl-L-tyrosin |       |      | Glycyl-L-prolin |       |      | L-Valyl-glycin |       |      |
|------------------------------|------------------------|-------|------|------------------|-------|------|-----------------|-------|------|----------------|-------|------|
|                              | La                     | CeIII | CeIV | La               | CeIII | CeIV | La              | CeIII | CeIV | La             | CeIII | CeIV |
| 0                            | -                      | -     | -    | -                | -     | -    | -               | -     | -    | -              | -     | -    |
| 3                            | -                      | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    | -              | +     | +    |
| 6                            | -                      | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    | -              | +     | +    |
| 24                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 48                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 72                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 96                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 192                          | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 37°                          |                        |       |      |                  |       |      |                 |       |      |                |       |      |
| 0                            | -                      | -     | -    | -                | -     | -    | -               | -     | -    | -              | -     | -    |
| 3                            | -                      | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    | -              | +     | +    |
| 6                            | -                      | +     | +    | -                | +     | +    | -               | +     | +    | -              | +     | +    |
| 24                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 48                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 72                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 96                           | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 192                          | +                      | +     | +    | +                | +     | +    | +               | +     | +    | +              | +     | +    |
| 70°                          |                        |       |      |                  |       |      |                 |       |      |                |       |      |

- = keine Spaltung; + = mäßige Spaltung; ++ = gute Spaltung; +++ = starke Spaltung; ++++ = äußerst starke Spaltung; +++++ = stärkste Spaltung  
\*) Die wichtigsten zum Spaltungsverlauf gehörenden chromatographischen Abbildungen sind wiedergegeben bei: A. ROTHER, Dissertation. Univ. München 1958.

4. *Chromatographische Methoden:* a) *qualitativ:* Gut bewährte sich das aufsteigende Verfahren (Papier Schleicher & Schüll 2043b Mgl) in einem Gemisch aus n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), wobei nach Trennung des Gemisches die obere Phase als Entwicklungsflüssigkeit diente. Die Anfärbung der Chromatogramme erfolgte mittels Ninhydrins („MERCK“ List. Nr. 6762). Um die entstehenden Flecke haltbar zu machen, wurden sie mit Hilfe des folgenden Sprühreagenzes in ihre Kupferkomplexe übergeführt: 1 ccm gesätt. Kupfernitratlösung wird mit 0.02 ccm Salpetersäure p. a. (etwa 65-proz. „MERCK“) versetzt und mit 95-proz. Methanol auf 100 ccm aufgefüllt.

b) *quantitativ:* Den quantitativen Spaltungsverlauf von Glycyl-leucin haben wir nach der von W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. PLÖCKL<sup>7)</sup> angegebenen Methode ermittelt. Auf 12 cm breiten Streifen (Schleicher & Schüll 2043b Mgl) wurden die Versuchsproben aufgetragen und in einem Gemisch Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) aufsteigend chromatographiert. Das von J. BRÜGGEMANN und K. DREPPER<sup>19)</sup> angegebene Ninhydrin-Sprühreagenz diente zur Anfärbung der Chromatogramme. Die Flecken wurden nach der Trocknung mit Transparenzlösung ( $\alpha$ -Brom-phenolphthalein in Paraffinöl, Brechungsindex 1.51) durchtränkt, in zwei Glasplatten eingebettet und bei einer Wellenlänge von 546 m $\mu$  photometriert. Die erhaltenen Kurven werteten wir planimetrisch aus. Zu jeder Messung wurde eine Eichkurve von mitchromatographiertem Glykokoll aufgestellt.

19) Naturwissenschaften 39, 301 [1952].

## HORST BAGANZ, LOTHAR DOMASCHKE und GUY SCHNEIDER

### Über 1.2-Dialkoxy-äthene, IX <sup>1)</sup>

### Pyrolyse und Alkoholyse von Chlorderivaten der 1.2-Dialkoxy-äthane und -äthene

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin-Charlottenburg  
(Eingegangen am 14. Mai 1958)

Die Pyrolyse der 1.2-Dichlor-1.2-dialkoxy-äthane und 1-Chlor-1.2-dialkoxy-äthene liefert Alkoxyessigsäure-alkylester und Alkylchlorid. Während bei der Pyrolyse des 1.2-Dichlor-1.2-diäthoxy-äthens vorwiegend Äthylchlorid und nur in geringen Mengen Äthylen abgespalten wird, findet beim 1.2-Dichlor-1.2-dibutyloxy-äthen ausschließlich Butylen-Abspaltung unter Bildung von Chlorbutyloxy-acetylchlorid statt. Die Pyrolyse der 1.1.2.2-Tetrachlor-1.2-dialkoxy-äthane ergab Dichlor-alkoxy-acetylchlorid.

Bei Versuchen, durch direkte Chlorierung der 1.2-Dichlor-1.2-dialkoxy-äthane bei erhöhter Temperatur in einer Stufe zu den 1.1.2.2-Tetrachlor-1.2-dialkoxy-äthanen, den Ausgangsprodukten für die Orthooxalsäure-hexaalkylester<sup>1)</sup>, zu gelangen, wurde beobachtet, daß die Dihalogen-äther bei erhöhter Temperatur unter Normaldruck

1) VIII. Mitteil.: H. BAGANZ und K.-E. KRÜGER, Chem. Ber. 91, 806 [1958].