

HORST GNICHTEL und WILLI LAUTSCH †

Über die Synthese von Peptid-Derivaten des Porphyrins c *)

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 7. Dezember 1964)

Durch Umsetzung von Dibromid I aus Hämatoporphyrin-IX mit Cystein und Cysteinpeptiden in Dioxan wurden 2.4. α . α' -Bis-[S-L-cystein]-mesoporphyrin-IX (Porphyrin c) und drei Peptidderivate dargestellt. Durch vorsichtige Einführung des Eisens konnten die entsprechenden Hämine erhalten werden.

Porphyrin c, der Chromophor des Cytochroms c, ist ein 2.4. α . α' -Bis-[S-L-cystein]-mesoporphyrin-IX, wie H. THEORELL^{1,2)} und K. ZEILE³⁾ gezeigt haben. Es ist über die beiden Cysteinreste in eine Peptidkette von 104 Aminosäuren eingebaut, deren Sequenz in jüngster Zeit vollständig aufgeklärt wurde⁴⁾.

Die Synthese des Dicystein-mesoporphyrins-IX (IIa) gelang erstmals K. ZEILE und H. MEYER³⁾ durch Verschmelzen von L-Cysteinhydrochlorid mit dem rohen, durch Ferrichlorid verunreinigten Dibromid I aus Hämatoporphyrin-IX. Auch aus „reduziertem Protoporphyrin“ und Cystein erhielten T. L. POPPER und H. TUPPY⁵⁾ Porphyrin c.

Das synthetische Produkt wurde von ZEILE über den Tetramethylester gereinigt. J. B. NEILANDS und H. TUPPY⁶⁾ isolierten das Porphyrin IIa durch Chromatographie an Celite. Die synthetisch gewonnene Verbindung erwies sich bis auf die sterische Anordnung an den Kohlenstoffatomen 2 α und 4 α' mit dem aus Cytochrom c gewonnenen Produkt identisch.

Die Synthese ist in dieser Form besonders für Cysteinpeptide sehr unbefriedigend. Wir haben deshalb versucht, schonendere und bessere Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von I mit der Mercaptogruppe des Cysteins zu finden. Durch die Empfindlichkeit des Cysteins und Porphyrins sind die Möglichkeiten hierfür begrenzt.

Um eine Substitution in α -Stellung zu erreichen, schien es notwendig, vom Hämatoporphyrin oder einem Derivat auszugehen. Wird Cystein direkt an die Vinyl-Doppelbindungen von Protoporphyrin addiert, so ist mit einer β -Substitution zu rechnen, wie aus den Versuchen von B. HOLMBERG⁷⁾ hervorgeht.

Wir haben deshalb ebenso wie ZEILE Cystein und Hämatoporphyrindibromid I kondensiert, dieses aber in reiner Substanz eingesetzt, da Beimengungen von Eisen(III)-bromid die Oxydation des Cysteins katalysieren.

*) Unter Verwendung der Dissertat. H. GNICHTEL, Freie Univ. Berlin 1958. Siehe auch *Angew. Chem.* **73**, 28 [1961].

1) *Biochem. Z.* **298**, 242 [1938].

2) *Enzymologia* **6**, 88 [1939].

3) K. ZEILE und H. MEYER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **262**, 178 [1939/40].

4) E. MARGOLASH, E. L. SMITH, G. KREIL und H. TUPPY, *Nature [London]* **192**, 1125 [1961].

5) *Acta chem. scand.* **17**, Suppl. I, 47 [1963].

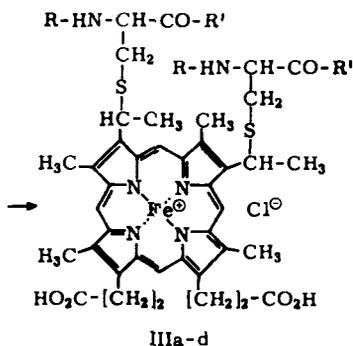
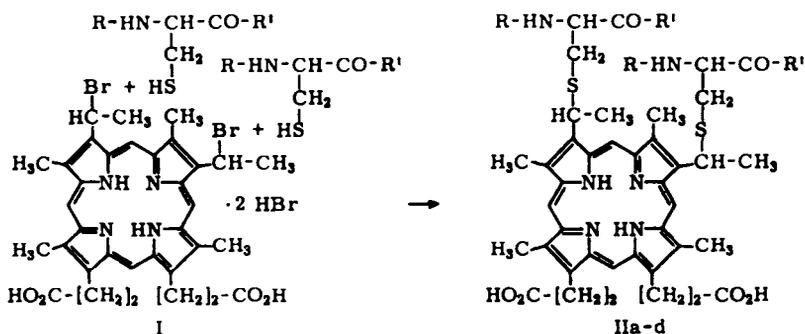
6) *Biochim. Biophysica Acta* **38**, 351 [1960].

7) *J. prakt. Chem. [2]* **141**, 93 [1934].

Den bei der Reaktion freierwerdenden Bromwasserstoff haben wir zunächst durch organische Basen zu binden versucht. Wir mußten aber feststellen, daß hierdurch keine Kondensation, sondern Abspaltung von Bromwasserstoff unter Bildung von Protoporphyrin eintrat.

Überraschend gut gelang dagegen die Reaktion in Dioxan zu einem Porphyrinderivat, das nicht mehr durch Äther extrahierbar und leicht in Wasser löslich war. Am isoelektrischen Punkt bei pH 4–5 flockte die Substanz aus. Durch multiplikative Verteilung zwischen 0.01 *n* HCl und *n*-Butanol wurde dieses Rohprodukt in eine langsam laufende Fraktion ($G \approx 0.1$) und eine kleinere, schnell laufende Fraktion ($G \approx 17$) aufgetrennt. Die erste ist die erwünschte Verbindung IIa, während es sich bei der zweiten Fraktion um Monosubstitutionsprodukte handelt. IIa ließ sich aus wäßrigem Äthanol umkristallisieren und analysenrein in 55-proz. Ausbeute erhalten.

Den Nachweis der Thioätherbindung erbrachten wir durch die Spaltung mit Silber-Ionen, wie sie auch am natürlichen Cytochrom *c* durchgeführt wurde^{8,9)}. Als Spaltprodukt konnten wir Hämatoporphyrin-IX isolieren, so daß die Konstitution der Verbindung gesichert ist. Zum Vergleich mit der von ZEILE dargestellten Verbindung wurde der Tetramethylester hergestellt, der das gleiche Absorptionsspektrum aufwies. Der Ester verändert sich mit der Zeit, wie die Verteilung zwischen Äther und Pufferlösung zeigte. Vermutlich tritt eine Kondensation der Aminosäureester ein. Wir haben deshalb das Tetrahydrochlorid des Tetramethylesters dargestellt, das als Ausgangsprodukt für Peptidsynthesen geeignet ist.



| | R | R' |
|---|--------------------------------------|--|
| a | H | OH |
| b | H ₂ N-CH ₂ -CO | OH |
| c | H | HN-CH ₂ -CO ₂ H |
| d | H | HN-CH-CO ₂ H [CH ₂] ₂ -CO ₂ H |

8) K. G. PAUL, Acta chem. scand. 4, 239 [1950].

9) K. G. PAUL, Acta chem. scand. 5, 389 [1951].

Der günstige Verlauf der Umsetzung ermöglichte es, Cysteinpeptide einzusetzen. Die Hydrochloride von Glycyl-L-cystein, L-Cysteinyl-glycin und L-Cysteinyl-L-glutaminsäure erhielten wir aus den entsprechenden *N*-Benzyloxycarbonyl-*S*-benzylbenzylestern, die nach konventionellen Verfahren dargestellt wurden. Die Schutzgruppen wurden in flüssigem Ammoniak mit Natrium abgespalten und die Peptide über die Quecksilbermercaptide isoliert. Da es sich um sehr hygroskopische, luftempfindliche Substanzen handelt, verzichteten wir auf die Reindarstellung und setzten sofort 40–70 Stdn. bei 65–80° mit dem Porphyrin I um. Die wasserlöslichen Verbindungen II b–d wurden ebenfalls durch multiplikative Verteilung zwischen 0.01 *n* HCl und *n*-Butanol gereinigt.

Die hydrophoben Eigenschaften des Porphyringerüsts werden durch die Peptidkomponente aufgehoben, so daß die Löslichkeit in Wasser sehr gut ist.

Da die Verbindungen II a–d bis 300° keinen Schmelzpunkt haben, charakterisierten wir sie durch die Absorptionsspektren in wäßrigem Pyridin. Die Absorption der Porphyrine im Bereich 500–700 m μ ist charakteristisch für die Art und die Anordnung der Substituenten. Die Bis-cysteinmesoporphyrine II a–d, die dem Hämato-porphyrin-IX verwandt sind, absorbieren etwa 1 m μ längerwellig als dieses. Lage und Extinktion der Banden sind unabhängig vom Peptidrest. Dies steht im Einklang mit den Spektren von Mesoporphyrin-IX-bis-peptidestern¹⁰⁾.

Tab. 1. Absorptionsmaxima der Porphyrine in Pyridin/Wasser (9:1), Extinktionen in log ϵ

| | 503.5 | 538.0 | 572.0 | 626.5 | m μ |
|------|-------|-------|-------|-------|---------|
| II a | 4.25 | 4.03 | 3.89 | 3.63 | |
| II b | 4.10 | 4.00 | 3.84 | 3.61 | |
| II c | 4.19 | 4.02 | 3.90 | 3.63 | |
| II d | 4.21 | 4.05 | 3.97 | 3.72 | |

Die Cysteinporphyrine II a–d lassen sich nicht so leicht in die Hämine III a–d überführen, wie es von anderen Verbindungen her bekannt ist. Es besteht die Gefahr, daß das Eisensalz die Thioätherbindung spaltet. Wir haben deshalb die Porphyrine mit höchstens 10-proz. Überschuß an Eisenacetat in Essigsäure umgesetzt und das Lösungsmittel bei mäßiger Temperatur im Vakuum abdestilliert. Die durch die Siedekapillare eintretende Luft reicht hin, um den instabilen Eisen(II)-Komplex zu oxydieren und Hämin zu erhalten, deutlich erkennbar am Farbumschlag von Kirschrot nach Rotbraun.

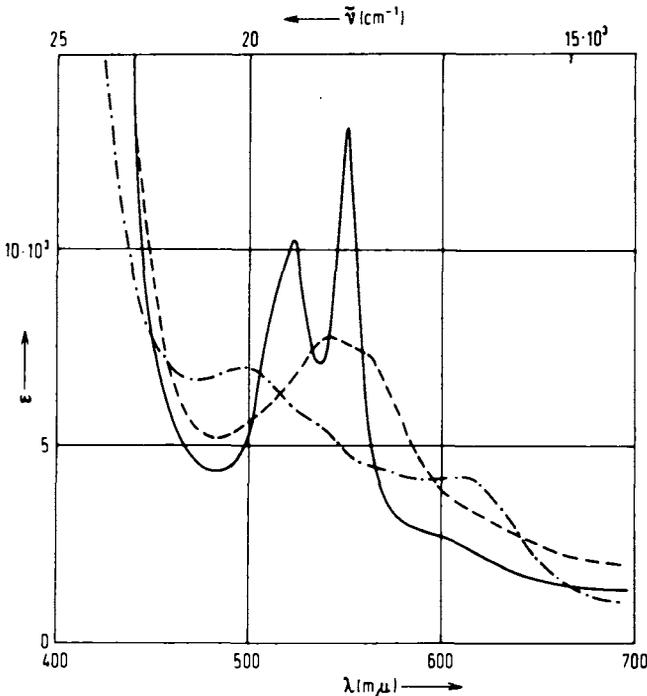
Tab. 2. Absorptionsmaxima der Pyridin-Hämochromogene in wäßrigem Pyridin, Extinktionen in log ϵ

| | 550.5 | 521 | m μ |
|-------|-------|------|---------|
| III a | 4.37 | 4.16 | |
| III b | 4.33 | 4.17 | |
| III c | 4.37 | 4.16 | |
| III d | 4.38 | 4.22 | |

¹⁰⁾ B. WIEMER, Dissertat. Freie Univ. Berlin 1961, S. 26.

Die Hämine charakterisierten wir durch die Absorptionsspektren ihrer Hämochromogene. Hierzu wurden die Lösungen in wäßrigem Pyridin mit Natriumdithionit reduziert. Die Spektren der Pyridin-Hämochromogene stimmen für die Verbindungen IIIa–d überein, wie Tab. 2 zeigt.

In Phosphatpuffer von pH 7.3 zeigen die Hämine IIIa–d ein unspezifisches Spektrum (Abbild.).



Absorptionsspektren in Phosphatpuffer, pH 7.3, von ····· Häm IIIa, — · — Häm (IIIa mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert) und ——— Imidazol-Hämochromogen (IIIa + Imidazol + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Durch Reduktion mit Natriumdithionit bildet sich die breite Bande der Häme aus. Dies beweist, daß die Aminogruppen der Peptidreste in diesem pH-Bereich nicht zur Komplexbildung befähigt sind. Erst durch Zugabe von Imidazol treten die beiden Banden des Hämochromogens auf, die für die vier Verbindungen übereinstimmen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

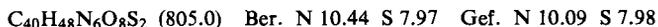
Die Spektren wurden mit dem Spektralphotometer DK 2 der Fa. Beckman aufgenommen.

2.4.a.a'-Bis-[S-L-cystein]-mesoporphyrin-IX (Porphyrin c) (IIa): 4.43 g (5.0 mMol) Dibromid I aus Hämatoporphyrin¹¹⁾ wurden mit 4.7 g (30 mMol) L-Cysteinhydrochlorid in 25 ccm Dioxan (über Na und LiH destilliert) 5 Stdn. im Ölbad auf 110–120° erhitzt. Die anfangs tiefrote Lösung hellte sich auf, am Boden bildete sich ein Schmelzkuchen. Das

¹¹⁾ R. WILLSTÄTTER und M. FISCHER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 87, 440 [1913].

Dioxan wurde dekantiert, der Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst, filtriert und die Lösung mit verd. Ammoniak auf pH 4–5 eingestellt. Das ausgeflockte Porphyrin wurde zentrifugiert und mit Wasser gewaschen. 3.7 g Rohausb.

Zur Abtrennung der Monosubstitutionsprodukte wurde zwischen n-Butanol und 0.01 *n* HCl verteilt: Die Lösung von je 1 g Rohprodukt in 25 ccm Unterphase wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Nach 36 Verteilungsschritten wurde die Fraktion $G = 0.1$ i. Vak. unter Stickstoff konzentriert, mit verd. Ammoniak alkalisch gemacht und mit verd. Essigsäure auf pH 4–5 gebracht. Das *Porphyrin* wurde abzentrifugiert und mit Wasser und Äthanol gewaschen. Gesamtausb. 2.2 g (55%). Zur Analyse wurde aus 50-proz. Äthanol umkristallisiert. Kleine Kristallaggregate.



IIa ist unlöslich in Äther, Äthanol, absol. Pyridin; löslich in Eisessig.

Nachweis der Thioätherbindung: Eine Lösung von etwas *IIa* in 20-proz. Essigsäure wurde mit dem gleichen Vol. gesätt. *Silbersulfat*-Lösung versetzt. Nach einer $\frac{1}{2}$ Stde. bei 50–60° ließ sich das ausgeflockte Porphyrin vollständig mit Äther extrahieren. Salzsäurezahl 0.1. Das Porphyrin stimmt spektroskopisch mit *Hämatoporphyrin-IX*¹²⁾ überein. Absorptionsmaxima in Chloroform 506, 540, 575, 632 m μ .

IIa-Tetramethylester

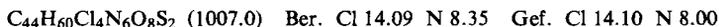
a) 1.5 g rohes *Porphyrin* wurden in 150 ccm *methanol*. Salzsäure über Nacht stengelassen. Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von ZEILE¹³⁾: Es wurde in 1 l Eiswasser gegossen, mit verd. Ammoniak auf pH 3 gebracht, nach Zugabe von 2 l Äther vorsichtig unter häufigem Schütteln mit 0.2 *n* NH₃ auf pH 5 eingestellt, der Ester vollständig extrahiert und der Extrakt 2 mal mit Wasser gewaschen. Aus der Ätherlösung zog man den Farbstoff mit *m*/15 Citratpuffer, pH 3, aus, setzte dann pro l Pufferlösung 60 ccm 1 *n* NaOH zu, so daß pH 5 resultierte und extrahierte vollständig mit Äther. Die Fraktionierung wurde wiederholt, es wurde mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur unter Stickstoff i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser verrieben, abgesaugt und bei 0° i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 854 mg (53.5%).



Absorptionsmaxima in Chloroform: λ_{max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) 503 (17.90); 538 (10.72); 572 (7.65); 626 m μ (4.48) (Lit. s. l. c.¹³⁾).

b) Eine Lösung von 0.1 g reinem *IIa* in 10 ccm absol. *Methanol* wurde mit 0.3 ccm konz. Schwefelsäure auf dem Wasserbad erhitzt, bis die Veresterungsprobe positiv ausfiel. Nach Zugabe von 30 ccm Chloroform wurde der Alkohol mit 50 ccm Wasser ausgewaschen und die Chloroformlösung mit verd. Sodalösung entsäuert. Nach Eindampfen i. Vak. bei Raumtemp. wurde über P₂O₅ scharf getrocknet und aus Äthanol/Petroläther umgefällt. Ausb. 80%.

Tetrahydrochlorid: In die Lösung von 2.3 g *Tetramethylester* in 100 ccm absol. Chloroform wurde bei 0° trockener *Chlorwasserstoff* eingeleitet. Bei Raumtemp. wurde unter Stickstoff und Feuchtigkeitsausschluß i. Vak. konzentriert und mit trockenem Petroläther gefällt. Ausb. 2.6 g (97.5%). Zur Analyse wurde aus absol. Äthanol/Petroläther umgefällt. Schmp. 144–146°.



¹²⁾ H. FISCHER und H. ORTH, „Die Chemie des Pyrrols“ II/1, S. 423, Akad. Verlagsgesellschaft GmbH., Leipzig 1937.

¹³⁾ K. ZEILE und H. MEYER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **262**, 192 [1939/40].

2.4.α.α'-Bis-[S-L-cystein]-mesohämin-IX (Hämin c) (IIIa): 0.10 mMol IIa wurden in 1 ccm Wasser und 2 ccm Eisessig mit 10 mg NaCl versetzt und auf dem Wasserbad auf 40° erwärmt. Nach Zugabe von Eisen(II)-acetat in Eisessig (0.11 mMol Fe, 1.75 ccm einer heiß gesätt. Lösung aus Fe und Eisessig) wurde die Essigsäure i. Vak. langsam abdestilliert. Die kirschrote Farbe schlägt nach Braun um. Der Rückstand wurde mit 10-proz. Essigsäure und Wasser gewaschen. Ausb. 90%.

$C_{40}H_{46}ClFeN_6O_8S_2$ (894.2) Ber. Fe 6.25 N 9.40 S 7.18 Gef. Fe 6.32 N 9.22 S 6.88

Der Eisengehalt wurde nach Zerstörung der organischen Substanz mit konz. Schwefelsäure/H₂O₂ kolorimetrisch als Dipyridylkomplex bestimmt¹⁴⁾.

Absorptionsmaxima: Pyridin-Hämochromogen s. Tab. 2. Imidazol-Hämochromogen in Phosphatpuffer, pH 7.3 (mit Na₂S₂O₄ reduziert): λ_{max} (log ε) 550.5 (4.15); 521 mμ (4.01). (Abbild.).

N-Benzoyloxy-carbonyl(Z)-glycyl-S-benzyl-L-cystein-benzylester

a) 20 g *N-Z-Glycin-cyanmethylester*¹⁵⁾ und 50 g *S-Benzyl-L-cystein-benzylester·HCl*¹⁶⁾ wurden unter Zusatz von 30 ccm *Triäthylamin* und 0.5 ccm Eisessig in 200 ccm Tetrahydrofuran 1½ Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wurde in 400 ccm Essigester aufgenommen, mit 0.2 n HCl, 3-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, nach Konzentrieren i. Vak. durch Zugabe von Petroläther kristallisiert und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 19 g (48%), Schmp. 96–97° (Lit.¹⁷⁾: 97°).

b) 37.2 g *S-Benzyl-L-cystein-benzylester·HCl* wurden in 200 ccm Tetrahydrofuran und 2 ccm Wasser aufgeschlämmt, auf –10° gekühlt und mit 15.3 ccm *Triäthylamin* versetzt. Nach 45 Min. Rühren wurden 20 g Natriumsulfat zugegeben und nach weiteren 15 Min. wurde filtriert. — Man gab 20.9 g *N-Z-Glycin* und 20.63 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in je 50 ccm Tetrahydrofuran unter Rühren und Kühlen hinzu, fügte nach 3 Stdn. 1 ccm Eisessig zu, filtrierte nach 3 Stdn. und brachte i. Vak. zur Trockne. Wie unter a) wurde aufgearbeitet. Ausb. 40 g (80%).

Glycyl-L-cystein-hydrochlorid: 19 g *N-Z-Glycyl-S-benzyl-L-cystein-benzylester* wurden in 300 ccm flüssigem Ammoniak mit Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung reduziert. Nach Entfärben mit NH₄Cl und Abdampfen des Ammoniaks (zum Schluß i. Vak.) wurde in 200 ccm eiskaltem ausgekochtem Wasser aufgenommen, mit verd. Schwefelsäure angesäuert und mit Äther unter Stickstoff Toluol und Bibenzyl extrahiert. Aus der gekühlten wäßr. Lösung wurde mit HOPKINSScher Lösung¹⁸⁾ das *Mercaptid* gefällt und gründlich mit Wasser gewaschen. Ausb. 18 g.

In die kräftig turbinierte Aufschlämmung des *Mercaptids* in 100 ccm Wasser wurde 2 Stdn. *Schwefelwasserstoff* geleitet, dann vom Sulfid abgesaugt und dieses noch 2mal ½ Stde. mit je 100 ccm Wasser und H₂S behandelt. Die vereinigten Lösungen versetzte man mit 1 ccm konz. Salzsäure und 10 g BaCl₂·2H₂O in 20 ccm Wasser, zentrifugierte das Bariumsulfat ab, brachte die Lösung bei 25–30° unter Stickstoff i. Vak. zur Trockne, trocknete den Rückstand über P₂O₅ und KOH scharf und kristallisierte aus 150 ccm absol. Äthanol und 350 ccm absol. Äther um. Ausb. 5.0 g (58%), Schmp. 97–98° (Zers.) (Lit.^{19,20)}: 91–96°).

14) K. G. PAUL, Acta chem. scand. **2**, 434 [1948].

15) R. W. HOLLEY und H. D. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3074 [1952].

16) K. C. HOOPER, H. N. RYDON und J. A. SCHOFIELD, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3151.

17) K. C. HOOPER, H. N. RYDON, J. A. SCHOFIELD und G. S. HEATON, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3154.

18) E. C. KENDALL, B. F. MCKENZIE und H. L. MASON, J. biol. Chemistry **84**, 657 [1929].

19) J. C. SHEEHAN und V. S. FRANK, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1856 [1949].

20) N. W. PIRIE, Biochem. J. **25**, 614 [1931].

2.4.a.α'-Bis-[S-(glycyl-L-cystein)]-mesoporphyrin-IX (IIb): 2.22 g I und 4.3 g Glycyl-L-cystein·HCl wurden mit 50 ccm Dioxan bei 65–70° im Ölbad 5 Tage gerührt. Nach Zusatz von absol. Äther wurde dekantiert, mit Äther gewaschen und aus der wäbr. Lösung bei pH 5 das Porphyrin gefällt (1.2 g).

Das Rohprodukt wurde zwischen n-Butanol und 0.01 n HCl über 24 Stufen verteilt und die Fraktion $G = 0.14$ wie bei IIa isoliert. Ausb. 0.56 g rote Kristallaggregate (aus 50-proz. Äthanol).



Hämין IIIb: 91.9 mg (0.10 mMol) IIb wurden analog IIIa umgesetzt. Ausb. 100 mg (100%).

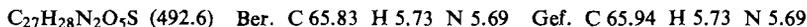


Absorptionsmaxima: Pyridin-Hämochromogen s. Tab. 2. Imidazol-Hämochromogen in Phosphatpuffer, pH 7.3 (mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert): λ_{max} (log ϵ) 550.5 (4.18); 521 m μ (4.12).

N-Z-S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-benzylester: Die Aufschlammung von 4.05 g Glycin-benzylester-p-toluolsulfonat²¹⁾ in 40 ccm Tetrahydrofuran wurde bei 0° mit 1.67 ccm Triäthylamin versetzt. Nach 30 Min. wurde vom ausgeschiedenen Salz abfiltriert.

Weiter gab man zu 3.46 g N-Z-S-Benzyl-L-cystein²²⁾, 1.4 ccm Triäthylamin und 30 ccm Tetrahydrofuran bei –10° unter Rühren 0.95 ccm Chlorameisensäure-äthylester.

Nach 30 Min. wurden beide Lösungen vereinigt, 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und über Nacht stehengelassen. Die filtrierte Lösung wurde i. Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand in 100 ccm Essigester aufgenommen und mit 0.2 n HCl, 3-proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Nach Konzentrieren auf 20 ccm wurde zur heißen Lösung Ligroin zugesetzt. Ausb. 2.83 g (57.5%). Aus Essigester/Ligroin Nadeln vom Schmp. 125°. $[\alpha]_D^{25}$: –24.6° ($c = 2.1$, in Essigester).



2.4.a.α'-Bis-[S-(L-cysteinyl-glycin)]-mesoporphyrin-IX (IIc)

a) L-Cysteinyl-glycin-hydrochlorid wurde aus N-Z-S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-benzylester in flüssigem Ammoniak analog Glycyl-L-cystein·HCl in 63-proz. Ausb. erhalten. Zers.-P. 97°.

b) 5.2 g L-Cysteinyl-glycin·HCl und 2.7 g I¹¹⁾ wurden in 50 ccm Dioxan 6 Tage bei 70° gerührt. Nach Zugabe des gleichen Vol. Äther wurde dekantiert, in Wasser gelöst und bei pH 5 das Porphyrin gefällt. Rohausb. 2.2 g.

Zur Reinigung wurde in 30 Stufen zwischen 0.01 n HCl und n-Butanol verteilt und die langsam laufende Fraktion ($G = 0.1$) isoliert. Aus ammoniakalischer Lösung wurde mit Essigsäure gefällt. Ausb. 1.39 g (50.3%). Zur Analyse kristallisierte man aus 50-proz. Äthanol um.



Hämין IIIc: Aus 91.9 mg IIc wurden 70 mg IIIc (69.5%) erhalten.



Absorptionsmaxima: Pyridin-Hämochromogen s. Tab. 2. Imidazol-Hämochromogen in Phosphatpuffer, pH 7.3 (reduziert mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$): λ_{max} (log ϵ) 550.5 (4.16); 521 m μ (4.07).

L-Glutaminsäure-dibenzylester-p-toluolsulfonat: 160 ccm Benzylalkohol, 30 g L-Glutaminsäure und 38 g p-Toluolsulfonsäure wurden auf dem Wasserbad bis zur Homogenität erhitzt. Nach Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff wurde das Wasser azeotrop abdestilliert. Aus der

²¹⁾ J. D. CIPERA und R. V. V. NICHOLLS, Chem. and Ind. 1955, 16.

²²⁾ B. HEGEDUS, Helv. chim. Acta 31, 737 [1948].

eiskalten Lösung kristallisierte die Substanz aus. Aus Äthanol Ausb. 72 g (71%), Schmp. 140°, $[\alpha]_D^{20}$: +7.2° ($c = 2.43$, in Äthanol) (Lit.²³): Schmp. 142°, $[\alpha]_D$: +8.2°).

Der freie Ester wurde mit Chloroform-Ammoniak dargestellt²⁴) und durch Einleiten von HCl in die Äther-Lösung in das *Hydrochlorid* übergeführt. Aus Äthanol/Äther Ausb. 90%, Schmp. 102°, $[\alpha]_D^{25}$: +9.82° ($c = 3.14$, in 0.1 *n* HCl) (Lit.^{25,26}): Schmp. 100–102°, $[\alpha]_D^{25}$: +9.4°, $c = 1.5$ in 0.1 *n* HCl).

N-Z-S-Benzyl-L-cysteinyl-L-glutaminsäure-dibenzylester

a) Zur Aufschlammung von 4.16 g *L-Glutaminsäure-dibenzylester-HCl* in 40 ccm Tetrahydrofuran gab man unter Eiskühlung 1.55 ccm *Triäthylamin*. Nach einer Stde. bei 0° wurden zur filtrierten Lösung 2.06 g *Dicyclohexylcarbodiimid* und 3.45 g *N-Z-S-Benzyl-L-cystein* in Tetrahydrofuran zugesetzt, und 24 Stdn. wurde bei Raumtemp. stengelassen. Nach Zusatz von 0.5 ccm Eisessig wurde nach 3 Stdn. filtriert, i. Vak. zur Trockne gebracht, mit 0.2 *n* HCl, NaHCO₃ und Wasser gewaschen und konzentriert. Nach Zugabe von Ligroin kristallisierten 5.1 g (78%) aus. Nadeln aus Essigester/Ligroin, Schmp. 117.5–118.5°, $[\alpha]_D^{25}$: –23.1° ($c = 1.9$, in Essigester).

C₃₇H₃₈N₂O₇S (654.8) Ber. C 67.86 H 5.85 N 4.29 S 4.90

Gef. C 68.12 H 5.79 N 4.29 S 4.95

b) 6.92 g *N-Z-S-Benzyl-L-cystein* in 60 ccm absol. Tetrahydrofuran und 2.8 ccm *Triäthylamin* wurden bei –10° 1.9 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* unter Rühren zugefügt. Nach 20 Min. wurde eine Lösung von *L-Glutaminsäure-dibenzylester* (aus 11.4 g des *p*-Toluolsulfonats) und 3.1 ccm *Triäthylamin* in 80 ccm Tetrahydrofuran bei 0° durch 1/2stdg. Rühren erhalten) zugesetzt und nach 3 Stdn. bei Raumtemp. wie unter a) aufgearbeitet. Ausb. 7.7 g (50%).

2.4.α.α'-Bis-[S-(L-cysteinyl-L-glutaminsäure)]-mesoporphyrin-IX (II d)

a) *L-Cysteinyl-L-glutaminsäure-hydrochlorid* wurde, wie bei *Glycyl-L-cystein-HCl* beschrieben, in 50-proz. Ausb. hergestellt. Schmp. 98–100° (Zers.).

b) 5.7 g *L-Cysteinyl-L-glutaminsäure-HCl* und 4.5 g *I* wurden in 100 ccm Dioxan 3 1/2 Tage bei 75–80° gerührt. Dann wurde vom Dioxan abgessogen, mit Äther gewaschen, die wäbr. Lösung ammoniakalisch gemacht, mit Essigsäure neutralisiert und das ausgeflockte Rohprodukt durch eine 4-stufige Verteilung zwischen 0.01 *n* HCl und *n*-Butanol gereinigt. Die langsam laufende Fraktion wurde aus ammoniakalischer Lösung mit Essigsäure gefällt. Ausb. 370 mg. Zur Analyse wurde 2mal aus 50-proz. Äthanol umkristallisiert.

C₅₀H₆₂N₈O₁₄S₂ (1063.3) Ber. N 10.52 S 6.04 Gef. N 9.75 S 6.02

Häm in III d: 249.3 mg *II d* wurden analog *III a* in das *Häm in* übergeführt. Ausb. 240 mg (87%).

C₅₀H₆₀ClFeN₈O₁₄S₂ (1152.5) Ber. Fe 4.85 N 9.72 S 5.55 Gef. Fe 5.14 N 9.65 S 5.45

Absorptionsmaxima: *Pyridin-Hämochromogen* s. Tab. 2. *Imidazol-Hämochromogen* in Phosphatpuffer, pH 7.3 (reduziert mit Na₂S₂O₄): λ_{\max} (log ϵ) 550.5 (4.06); 521.0 $\mu\mu$ (3.95).

²³) N. IZUMIYA und S. MAKISUMI, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. (Nippon Kagaku Zasshi) **78**, 662 [1957], Zit. nach C. **1958**, 2404.

²⁴) G. HILLMANN, Z. Naturforsch. **1b**, 682 [1946].

²⁵) H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4610 [1953].

²⁶) B. HELFERICH, P. SCHELLENBERG und I. ULLRICH, Chem. Ber. **90**, 700 [1957].