

12. Zur Konstitution von Hypoglycin B

von A. Jöhl und W. G. Stoll

(2. XII. 58)

Hypoglycin B wurde erstmals von HASSALL & REYLE¹⁾²⁾ neben Hypoglycin A aus den unreifen Früchten der Sapindacee *Blighia sapida* isoliert. v. HOLT, LEPLA, KRÖNER & v. HOLT³⁾ zeigten, dass es sich bei Hypoglycin B um ein Peptid der Summenformel $C_{12}H_{18}O_5N_2$ handelt, welches bei der Hydrolyse in 50-proz. Ameisensäure oder gesättigter Bariumhydroxydlösung in Glutaminsäure und Hypoglycin A zerfällt. Die Autoren nahmen an, dass die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure an der Peptidbindung nicht beteiligt sei. Auf Grund dieser Angaben übernahm auch WILKINSON⁴⁾ die Auffassung, dass Hypoglycin B ein α -Glutamyl-peptid sei.

Hypoglycin B⁵⁾, gewonnen aus unreifen Früchten der *Blighia sapida* in Anlehnung an die Verfahren von HASSALL & REYLE²⁾ und v. HOLT & LEPLA⁶⁾, lieferte bei der Hydrolyse in 50-proz. Ameisensäure im geschlossenen Rohr bei 110° zwei mit Ninhydrin blau reagierende Aminosäuren, die in Übereinstimmung mit den Resultaten von C. v. HOLT u. Mitarbeitern³⁾⁶⁾ papierchromatographisch und elektro-phoretisch als Glutaminsäure und Hypoglycin A identifiziert werden konnten. Um Aufschluss über die Zugehörigkeit der Glutaminsäure zur D- oder L-Reihe zu erhalten, wurde Hypoglycin B in 6-n. HCl im geschlossenen Rohr bei 110° hydrolysiert. An Stelle von wässriger Ameisensäure wurde Salzsäure gewählt, um eine eventuelle Formylierung oder Bildung von 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure⁷⁾ zu vermeiden. Die aus Hypoglycin A bei der salzsauren Hydrolyse entstandenen neutralen Aminosäuren¹⁾²⁾⁶⁾⁸⁾ wurden am schwach basischen Ionenaustauscher Amberlite IR-4B von der Glutaminsäure getrennt. Die optische Aktivität der so gewonnenen Glutaminsäure $[\alpha]_D^{23} = +32,7^\circ (\pm 2^\circ)$ (c = 1; 6-n. HCl), [Lit.: L-Glutaminsäure $[\alpha]_D^{23,4} = +31,4^\circ$ (c = 1; 6-n. HCl)] liefert den Beweis, dass die Glutaminsäure des Hypoglycins B in der L-Form vorliegt.

Zur Bestimmung der aminoendständigen Aminosäure wurde die Methode von SANGER⁹⁾ angewandt. Dementsprechend wurde Hypoglycin B in wässrigem Milieu bei 40° mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt. Als säurebindende Base diente an Stelle von Alkalicarbonaten Triäthylamin. Die Ausbeute an DNP-Hypoglycin B¹⁰⁾,

1) C. H. HASSALL, K. REYLE & P. FENG, *Nature* **173**, 356 (1954).

2) C. H. HASSALL & K. REYLE, *Biochem. J.* **60**, 334 (1955).

3) C. v. HOLT, W. LEPLA, B. KRÖNER & L. v. HOLT, *Naturwiss.* **43**, 279 (1956).

4) S. WILKINSON, *Chemistry & Ind.* **1958**, 17.

5) Wir verdanken das Präparat Herrn Dr. U. RENNER, der es in den Laboratorien der Firma Dr. KARL THOMAE GmbH., Biberach a. d. Riss, isolierte.

6) C. v. HOLT & W. LEPLA, *Bull. Soc. chim. Belg.* **65**, 113 (1956).

7) Vgl. hierzu W. J. LE QUESNE & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* **1952**, 594.

8) W. LEPLA & C. v. HOLT, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **228**, 166 (1956); E. V. ELLINGTON, C. H. HASSALL & J. R. PLIMMER, *Chemistry & Ind.* **1958**, 329; U. RENNER, A. JÖHL & W. G. STOLL, *Helv.* **41**, 588 (1958).

9) R. R. PORTER & F. SANGER, *Biochem. J.* **42**, 287 (1948).

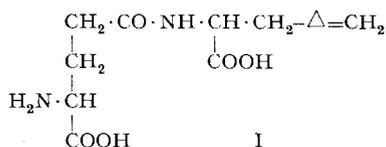
10) DNP = 2,4-Dinitrophenyl-.

Smp. 170–172°, betrug 93%. Das DNP-Peptid wurde in 50-proz. Ameisensäure im geschlossenen Rohr bei 110° hydrolysiert. Aus papierchromatographischen und elektrophoretischen Untersuchungen des Hydrolysates ging eindeutig hervor, dass DNP-Hypoglycin B nach dem folgenden Schema hydrolysiert wird:



Das gebildete gelbe DNP-Derivat war einzeln und im Gemisch mit einem authentischen Muster von DNP-Glutaminsäure, hergestellt nach LEVY & CHUNG¹¹⁾, identisch, währenddem die Ninhydrin-positive Aminosäure als Hypoglycin A identifiziert werden konnte. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass in Hypoglycin B L-Glutaminsäure die aminoendständige Aminosäure ist.

Es blieb weiter noch abzuklären, ob es sich bei Hypoglycin B um ein α - oder γ -Glutamylpeptid handelt. Nach VAN SLYKE, DILLON, MACFADYEN & HAMILTON¹²⁾ und SACHS & BRAND¹³⁾ liefern γ -Glutamyl-peptide bei der Reaktion mit Ninhydrin 1 Mol CO₂ pro Mol Peptid, während bei α -Glutamyl-peptiden keine CO₂-Entwicklung stattfindet. Bei der Carboxylbestimmung nach VAN SLYKE in einem Citratpuffer vom pH 2,5 lieferte Hypoglycin B 0,9 Mol CO₂ pro Mol Peptid (vgl. Tabelle). Aus diesem positiven Resultat, welches neben der freien α -Aminogruppe der aminoendständigen Aminosäure eine freie α -Carboxylgruppe fordert, ergibt sich die Folgerung, dass dem Hypoglycin B die Konstitution eines γ -L-Glutamyl-peptides der Formel I zuzuschreiben ist.



Als weiterer Beweis für diese Konstitution wurde die Bestimmung des Aminostickstoffs nach VAN SLYKE¹⁴⁾ herangezogen. SACHS & BRAND¹³⁾¹⁵⁾ zeigten an einer Reihe von Glutamyl-peptiden, dass γ -Glutamyl-dipeptide (freie α -Amino- und freie α -Carboxylgruppe) unter den gewöhnlichen VAN SLYKE-Bedingungen (NaNO₂/CH₃COOH/H₂O) ihren Gesamtstickstoff als Aminostickstoff (2 Mol N₂/1 Mol Peptid) abgeben, während α -Glutamyl-peptide korrekte Werte für eine Aminogruppe (1 Mol N₂/1 Mol Peptid) geben. Diese Tatsache ermöglicht eine klare Differenzierung zwischen α - und γ -Glutamyl-peptiden. VAN SLYKE-Aminostickstoffbestimmungen für Hypoglycin B, ausgeführt unter den üblichen Bedingungen, ergaben Werte, die 96% des Gesamtstickstoffes ausmachen (vgl. Tabelle). Dieses Resultat zeigt deutlich, dass bei Hypoglycin B nicht nur die freie Amino-, sondern auch die Amid-Gruppe mit HNO₂ reagiert haben muss, wie es für γ -Glutamyl-peptide die Regel ist. Die erhaltenen Aminostickstoffwerte stehen im Einklang mit dem Ergebnis der VAN SLYKE-Carboxylbestimmung und sprechen ebenfalls für Struktur I.

¹¹⁾ A. L. LEVY & D. CHUNG, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2899 (1955).

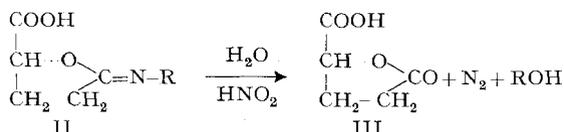
¹²⁾ D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON, D. A. MACFADYEN & P. HAMILTON, J. biol. Chemistry **141**, 627 (1941).

¹³⁾ H. SACHS & E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4608 (1953).

¹⁴⁾ D. D. VAN SLYKE, J. biol. Chemistry **9**, 185 (1911); **12**, 275 (1912); **16**, 121 (1913).

¹⁵⁾ H. SACHS & E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3601 (1954).

Überraschend war der Befund, dass die Aminostickstoffwerte für Hypoglycin B, bestimmt nach einem von KAINZ, HUBER & KASLER¹⁶⁾ modifizierten VAN SLYKE-Verfahren, nur mehr 54% bzw. 57% des Gesamtstickstoffes betragen. Der Unterschied zwischen der üblichen Methode von VAN SLYKE (*loc. cit.*) und dem Verfahren von KAINZ u. Mitarbeitern besteht darin, dass die letzteren die Desaminierung nicht in wässrigem, sondern in wasserfreiem Milieu ($\text{Br}_2/\text{Eisessig}/\text{NaNO}_2$) vornehmen. Wird für die anomale, aber typische Desaminierung der γ -Glutamyl-peptide die von SACHS & BRAND¹⁵⁾ aufgestellte Hypothese über den Reaktionsverlauf in Betracht gezogen, so können die unterschiedlichen Aminostickstoffwerte erklärt werden:



Die Autoren wiesen im Reaktionsgemisch der Aminostickstoffbestimmung von γ -Glutamyl-peptiden nach VAN SLYKE ein Lacton nach, dem sie die hypothetische Struktur III zuschrieben. Die Hydrolyse des 2-Imino-5-carboxy-tetrahydro-furans II zum Lacton III und einem Amin $\text{R}-\text{NH}_2$ verläuft unter VAN SLYKE-Bedingungen spontan, so dass HNO_2 auf die Aminogruppe des neu entstandenenamins $\text{R}-\text{NH}_2$ einwirken kann. Beim modifizierten VAN SLYKE-Verfahren, bei dem unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wird, dürfte die Reaktion beim 2-Imino-5-carboxy-tetrahydro-furan II zum Stillstand kommen und somit die «Anomalie» der γ -Glutamyl-peptide unterdrückt werden.

Als weiteren Beitrag zur Konstitution von Hypoglycin B berichten wir in einer folgenden Arbeit über die Synthese dieses Dipeptides.

Experimenteller Teil¹⁷⁾

Hypoglycin B. Das von uns verwendete Hypoglycin B, kristallisiert aus einem Gemisch von Wasser/Aceton und wenig Essigsäure, zeigt die folgenden Eigenschaften: $[\alpha]_D^{25} = +8,6^\circ (\pm 2^\circ)$ ($c = 2,03$; Wasser); Literatur²⁾: $[\alpha]_D^{25} = +9,6^\circ (\pm 2^\circ)$ ($c = 1,12$; Wasser); im Papierchromatogramm besitzt es in den Systemen PARTRIDGE¹⁸⁾ [n-Butanol-Eisessig-Wasser-(4:1:5)], Pyridin-Amylalkohol-Wasser-(7:6:6) und n-Butanol gesättigt mit Wasser die Rf-Werte 0,58, 0,22 und 0,04. Bei der Papierelektrophorese in einem Pyridin-Essigsäurepuffer vom pH 5,5 wandert Hypoglycin B als einheitlicher, Ninhydrin-positiver Fleck zur Anode, wobei die Mobilität etwas geringer ist als die der L-Glutaminsäure. Für weitere analytische Daten vgl. Tabelle.

Analytische Daten von Hypoglycin B, berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2$

Aminostickstoff (% N_2) n. VAN SLYKE ¹⁴⁾		Aminostickstoff (% N_2) n. modif. VAN SLYKE ¹⁶⁾		Stickstoff (% N_2) nach DUMAS		Carboxylbest. (% CO_2) n. VAN SLYKE ¹²⁾ ¹³⁾	
Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
5,18	9,94; 9,93	5,18	5,90; 5,63	10,36	10,20; 10,08	16,28	14,80

¹⁶⁾ G. KAINZ, H. HUBER & F. KASLER, *Microchim. Acta* **1957**, 744.

¹⁷⁾ Die Smp. sind uncorr. – Die Rf-Werte wurden in absteigenden Chromatogrammen auf WHATMAN-Papier Nr. 1 bestimmt. Elektrophoretische Analysen wurden auf WHATMAN-Papier Nr. 1 durchgeführt.

¹⁸⁾ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

Hydrolyse von Hypoglycin B in 50-proz. Ameisensäure. Eine Lösung von 0,2 g Hypoglycin B in 25 ml 50-proz. Ameisensäure wird in einem zugeschmolzenen Rohr 24 Std. auf 110° erhitzt. Das Hydrolysat lässt sich papierchromatographisch [PARTRIDGE-System n-Butanol-Eisessig-Wasser-(4:1:5)] in 2 mit Ninhydrin blau reagierende Substanzen auftrennen. Die eine, Rf 0,55, verhält sich wie natürliches Hypoglycin A, die andere, Rf 0,15, wie authentische L-Glutaminsäure. (Daneben treten in sehr untergeordneten Mengen 2 mit Ninhydrin gelb reagierende Produkte mit den Rf-Werten 0,44 und 0,32 auf. Sie dürften aus Hypoglycin A (vgl. ¹⁾²⁾⁶⁾⁸⁾) entstanden sein und können bei kurzer Hydrolysendauer papierchromatographisch nicht nachgewiesen werden.) Bei der Papierelektrophorese in einem Pyridin-Essigsäure-Puffer liefert das Hydrolysat 2 Ninhydrin-positive Substanzen, die die gleiche Mobilität wie Hypoglycin A bzw. L-Glutaminsäure besitzen.

Gewinnung von L-Glutaminsäure aus Hypoglycin B. 2 g Hypoglycin B werden in 30 ml 6-n. HCl im geschlossenen Rohr 18½ Std. auf 110° erhitzt. Das Hydrolysat wird im Hochvakuum bei einer Badtemperatur von 35° zur Trockne eingedampft. Die resultierenden Hydrochloride werden in 25 ml Wasser gelöst und auf eine Ionenaustauschersäule (Amberlite IR-4B (OH-Form), 42 × 2 cm) gebracht. Die neutralen Aminosäuren (vgl. theor. Teil) werden mit Wasser ausgewaschen. Sobald im Eluat keine Aminosäuren mehr nachzuweisen sind, wird die Glutaminsäure so lange mit 2-n. Essigsäure eluiert, bis die Reaktion mit Ninhydrin negativ ausfällt. Das Filtrat wird im Hochvakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand, welcher papierchromatographisch einheitlich und identisch mit Glutaminsäure ist, aus Wasser/Äthanol und unter Zusatz von wenig Essigsäure umkristallisiert. Ausbeute 0,87 g (80%); $[\alpha]_D^{23} = +32,7^\circ (\pm 2^\circ)$ (c = 1; 6-n. HCl).

DNP-Hypoglycin B. Eine Lösung von 1,5 g Hypoglycin B und 1,9 g Triäthylamin in 40 ml H₂O wird auf 40° erwärmt und unter intensivem Rühren (Vibromischer) mit 1,02 g 2,4-Dinitrofluorbenzol versetzt. Nach 45 Min. wird das Reaktionsgemisch mit Äther ausgezogen und die wässrige Phase mit 6-n. HCl angesäuert. Das abgeschiedene, ölige Reaktionsprodukt wird in Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung sorgfältig mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man 2,24 g (93%) DNP-Hypoglycin B. Umkristallisiert aus Essigester-Chloroform und Methanol-H₂O Smp. 170–172°.

C₁₈H₂₀O₉N₄ (436,37) Ber. C 49,54 H 4,62 N 12,84% Gef. C 49,69 H 4,63 N 12,65%

Hydrolyse von DNP-Hypoglycin B. 0,2 g DNP-Hypoglycin B werden in 25 ml 50-proz. Ameisensäure im geschlossenen Rohr 18 Std. auf 110° erhitzt. Im Papierchromatogramm (PARTRIDGE-System) zeigt das Hydrolysat einen gelben Flecken mit dem Rf 0,83 und einen Ninhydrin-positiven, mit dem Rf 0,55. Das papierchromatographische Verhalten des gelben DNP-Derivates ist gleich wie das eines authentischen Musters von DNP-L-Glutaminsäure¹¹⁾. Die Ninhydrin-positive Substanz und Hypoglycin A, isoliert aus den Früchten von *Blighia sapida*, besitzen einzeln und im Gemisch denselben Rf-Wert. Papierelektrophorese in einem Pyridin-Essigsäure-Puffer vom pH 5,5 trennt das Hydrolysat in 2 Produkte auf. Das DNP-Derivat wandert als gelber Fleck zur Anode und besitzt die gleiche Mobilität wie authentische DNP-L-Glutaminsäure, während der Ninhydrin-positive Anteil, der praktisch nicht wandert, sich als neutrale Aminosäure wie Hypoglycin A verhält.

Die Mikroanalysen, Aminostickstoff- und Drehungsbestimmungen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung Dr. H. WAGNER) ausgeführt.

SUMMARY

N-terminal amino acid analysis, VAN SLYKE amino nitrogen and VAN SLYKE carboxyl determinations give evidence that hypoglycin B is γ -L-glutamyl-hypoglycin-A. VAN SLYKE amino nitrogen determinations by the method of G. KAINZ *et al.* demonstrate that it is possible, at least in the case of hypoglycin B, to avoid the anomalous behavior (reaction of both the amino and the γ -amide groups with nitrous acid) of γ -glutamyl peptides with a free α -carboxyl group.

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. GEIGY A.G., Basel