

Das Kathodenpotential ist für alle vier Säuren bei gleicher Stromstärke nahezu dasselbe, was anzeigt, dass als primärer Vorgang die Wasserstoffionentladung angesehen werden muss.

Diese Feststellungen gelten für beide Versuchsreihen mit und ohne Äthanolzusatz zum Katholyten, insbesondere ist das Kathodenpotential weitgehend unabhängig von diesem Zusatz. Bei den Aminobenzoesäuren sind die Stromausbeuten im äthanolfreien Fall höher.

Der Vergleich der Stoffausbeuten als Mass der Reduktionsaktivität zeigt für die Versuche ohne Äthanolzusatz bei nicht zu hohen Stromstärken die theoretisch unter dem Einfluss der Aminogruppe zu erwartende Reihenfolge der Reduzierbarkeit der drei Monoaminobenzoesäuren, nämlich $m > o > p$.

Laboratorium für physikalische Chemie und Elektrochemie
der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

8. Derivate von L-Methionin-sulfoxyd und ihre Verwendung für Peptidsynthesen¹⁾

von B. Iselin

(12. XI. 60)

Bei der Synthese von Peptiden, die als Aminosäure-Komponente Methionin enthalten, treten häufig Nebenreaktionen auf, welche durch die Thioäther-Funktion des Methionins ausgelöst werden. Auf spezielle Schwierigkeiten stösst die Decarboxylierung von Carbobenzyloxy-methioninpeptiden.

Die Eliminierung der Carbobenzyloxygruppe gelingt zwar in einigen Fällen durch katalytische Hydrogenolyse; die Methode ist aber infolge der Vergiftung des Katalysators durch die Thioäthergruppe nicht allgemein anwendbar²⁾. Bei der Einwirkung von Bromwasserstoff in Eisessig³⁾ oder Nitromethan⁴⁾ auf Carbobenzyloxy-Derivate des Methionins oder bei deren Behandlung mit konz. Salzsäure⁵⁾ oder alkoholischer Salzsäure⁶⁾ wird das Methionin teilweise in S-Benzylhomocystein übergeführt. Als bisher geeignetste Methode hat sich die reduktive Decarboxylierung mittels Natrium in flüssigem Ammoniak erwiesen⁷⁾, obschon in einzelnen Fällen eine teilweise Demethylierung des Methionin-Schwefels⁸⁾⁹⁾ beobachtet worden ist.

Neuerdings ist vorgeschlagen worden, durch Zugabe von Methyläthylsulfid und Diäthylphosphit die bei der Decarboxylierung mit Bromwasserstoff auftretenden Nebenreaktionen

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen am 2. Europ. Peptid-Symposium in München (1959); vgl. *Angew. Chem.* **71**, 741 (1959).

²⁾ C. A. DEKKER, S. P. TAYLOR & J. S. FRUCTON, *J. biol. Chemistry* **180**, 155 (1949).

³⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **47**, 1852 (1958).

⁴⁾ N. F. ALBERTSON & F. C. MCKAY, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5323 (1953).

⁵⁾ C. A. DEKKER & J. S. FRUCTON, *J. biol. Chemistry* **173**, 471 (1948).

⁶⁾ O. GAWRON & F. DRAUS, *J. org. Chemistry* **23**, 1040 (1958).

⁷⁾ Siehe z. B. K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER & H. KAPPELER, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1636 (1957).

⁸⁾ J. A. STEKOL, *J. biol. Chemistry* **140**, 827 (1941).

⁹⁾ M. BRENNER & R. W. PFISTER, *Helv.* **34**, 2085 (1951).

zu verringern⁹⁾10), doch sind sie, nach unseren Erfahrungen, auch bei dieser Methode nicht völlig auszuschliessen. Bessere Resultate sind bei Verwendung von andern Schutzgruppen (Phталyl-, tert.-Butyloxy-carbonyl-⁸⁾11) anstelle der Carbobenzoxygruppe erzielt worden.

Ein in der Peptidchemie oft beschrittener Weg zur Eliminierung von Nebenreaktionen besteht in der temporären Substitution einer störenden funktionellen Gruppe in der Seitenkette von Aminosäuren. In der vorliegenden Arbeit wird über die vorübergehende Blockierung der Thioäther-Funktion des Methionins durch Überführung in das Sulfoxyd und über die Anwendung dieser Methode für Peptidsynthesen berichtet.

A. *Methionin-sulfoxyd*. DL-Methionin-sulfoxyd bildet sich in praktisch quantitativer Ausbeute durch Behandlung von DL-Methionin mit Hydrogenperoxyd¹²⁾ 13). Bei Versuchen mit L-Methionin stellten wir fest, dass bei Einwirkung eines geringen Überschusses an Hydrogenperoxyd in 1N Salzsäure oder Eisessig (Peressigsäure) das L-Methionin-sulfoxyd sehr rasch entsteht und nur langsam zu dem – für peptidsynthetische Zwecke unerwünschten – L-Methionin-sulfon weiteroxydiert wird¹⁴⁾ (Tab. I); erst bei höheren Konzentrationen an Hydrogenperoxyd¹⁵⁾ oder bei längerer Reaktionsdauer (speziell in Eisessig) lassen sich grössere Mengen an Sulfon nachweisen. Eine quantitative Bildung von L-Methionin-sulfon kann nur durch Katalyse mit Ammoniummolybdat erzielt werden¹⁶⁾.

Tabelle I. *Oxydation von L-Methionin*

Reaktionsbedingungen ^{a)}	Reaktionszeit (Std.)	Verhältnis (%)		Reaktionsbedingungen ^{a)}	Reaktionszeit (Std.)	Verhältnis (%)	
		Sulf-oxyd	Sulfon			Sulf-oxyd	Sulfon
1,2 Äquiv. 0,5N H ₂ O ₂ in 1N HCl	4	100	0	1,2 Äquiv. 0,5N H ₂ O ₂ in AcOH	2	100	0
desgl.	24	98	2	desgl.	20	95	5
5 Äquiv. 2N H ₂ O ₂ in 1N HCl	4	95	5	2,5 Äquiv. 1N H ₂ O ₂ in AcOH	2	95	5
desgl.	24	90	10	desgl.	20	70	30
20 Äquiv. 9N (= 30%) H ₂ O ₂	4	95	5	5 Äquiv. 2N H ₂ O ₂ in AcOH	2	90	10
desgl.	24	85	15	desgl.	20	40	60

^{a)} Vgl. Exper. Teil.

¹⁰⁾ St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 42, 1257 (1959).

¹¹⁾ R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 42, 1702 (1959).

¹²⁾ G. TOENNIES & J. J. KOLB, *J. biol. Chemistry* 128, 399 (1939).

¹³⁾ F. MICHEEL & H. SCHMITZ, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 72, 518 (1939).

¹⁴⁾ Dies entspricht den Befunden von G. TOENNIES & T. P. CALLAN, *J. biol. Chemistry* 129, 481 (1939); die von C. E. DENT, *Biochem. J.* 43, 169 (1948), geäusserte Ansicht, dass aus Methionin quantitativ das Sulfon entstehe, Methionin-sulfoxyd aber nicht weiter oxydiert werde, ist in diesem Sinne zu revidieren.

¹⁵⁾ Vgl. G. TOENNIES, *J. biol. Chemistry* 145, 667 (1942).

¹⁶⁾ Herstellung des DL-Methionin-sulfons: G. TOENNIES & J. J. KOLB, *J. biol. Chemistry* 140, 131 (1941).

Bei der Oxydation von L-Methionin mit Hydrogenperoxyd entsteht infolge des Auftretens eines zusätzlichen asymmetrischen Zentrums am S-Atom¹⁷⁾ ein Gemisch der diastereoisomeren L-Methionin-*d*- und -*l*-sulfoxyde¹⁸⁾, die sich über die Pikrate auftrennen lassen¹⁹⁾. Das leichter isolierbare L-Methionin-*d*-sulfoxyd zeigt, wie das am S-Atom racemische *d,l*-Sulfoxyd, im IR.-Spektrum die erwartete Sulfoxyd-Absorption mit 2 Maxima bei 9,74 und 9,87 μ . L-Methionin-*d*-sulfoxyd wird durch verdünnte Säuren oder Alkalien nicht verändert, erleidet aber bei kurzer Einwirkung von konz. Salzsäure eine Racemisierung am asymmetrischen S-Atom unter Bildung des L-Methionin-*d,l*-sulfoxyds; bei längerem Erhitzen mit konz. Salzsäure erfolgt eine langsame Reduktion zu Methionin (vgl. unten: Reduktion mit HBr). Die relativ hohe Beständigkeit des L-Methionin-sulfoxyds ist auffallend im Hinblick auf die leichte Zersetzung des nächst niedrigeren homologen S-Methyl-L-cystein-sulfoxyds durch Säuren und Alkalien^{20) 21)}.

B. *Derivate*. Die Oxydation der für Peptidsynthesen geeigneten L-Methionin-Derivate: Carbobenzoxyl-L-methionin, Carbobenzoxyl-L-methionin-methylester und Carbobenzoxyl-L-methionin-hydrazid durch Behandlung mit Hydrogenperoxyd in Methanol lieferte in guter Ausbeute die entsprechenden Sulfoxyde. Ein Überblick über die Differenzen zwischen den molaren Drehungen der L-Methionin- und der entsprechenden L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd-Derivate (Tab. II) zeigt, dass die molare Drehung des asymmetrischen α -C-Atoms der untersuchten Carbobenzoxylverbindungen des L-Methionins bei der Einführung des Sulfoxydsauerstoffs eine Veränderung von $+49^\circ \pm 5^\circ$ (in Eisessig) erfuhr. Die gute Übereinstimmung der Werte deutet darauf hin, dass die *d*- und *l*-Sulfoxyd-Derivate im gleichen Verhältnis gebildet wurden.

Im Gegensatz dazu ergab L-Methionin-methylester-hydrochlorid bei der Oxydation mit Hydrogenperoxyd in Methanol ein Sulfoxyd, in dem das Verhältnis von *d*- und *l*-Form ca. 80:20 betrug (bestimmt durch Verseifung zu L-Methionin-sulfoxyd; siehe Tab. III). Eine stereospezifische Einführung des Sulfoxyd-Sauerstoffs, wahrscheinlich bedingt durch die Anwesenheit eines weiteren asymmetrischen Zentrums in der Molekel, ist schon mehrfach beobachtet worden^{19) 22)}, doch lassen im vorliegenden Fall Betrachtungen am Modell noch keine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen zu.

Obschon, wie später gezeigt wird, die durch direkte Oxydation von L-Methionin-Derivaten gewonnenen Sulfoxyde die geeignetsten Ausgangsmaterialien für Peptidsynthesen darstellen, haben wir die Synthese und das Verhalten der optisch reinen *d*- und *l*-Sulfoxyde untersucht, wobei hauptsächlich die Bestimmung des molaren Drehungsbeitrags des asymmetrischen S-Atoms angestrebt wurde. Carbobenzoxyl-L-methionin-*d*-sulfoxyd liess sich unter den üblichen Bedingungen durch Carbobenzoxylisierung von L-Methionin-*d*-sulfoxyd herstellen; das entsprechende *l*-Sulfoxyd-

17) P. W. B. HARRISON, J. KENYON & H. PHILLIPS, J. chem. Soc. 1926, 2079.

18) Die Bezeichnungen *d*- und *l*- werden in dieser Arbeit zur Bezeichnung des positiven resp. negativen Drehungsbeitrags des asymmetrischen S-Atoms verwendet. Die absolute Konfiguration des *d*-Sulfoxyds entspricht wahrscheinlich derjenigen des S-Methyl-L-cystein-*d*-sulfoxyds; R. HINE & D. ROGERS, Chemistry and Ind. 1956, 1428.

19) T. F. LAVINE, J. biol. Chemistry 169, 477 (1947).

20) C. J. MORRIS & J. F. THOMPSON, J. Amer. chem. Soc. 78, 1605 (1956).

21) F. OSTERMAYER & D. S. TARBELL, J. Amer. chem. Soc. 82, 3752 (1960).

22) C. A. KINGSBURY & D. J. CRAM, J. Amer. chem. Soc. 82, 1810 (1960).

Tabelle II. Molarer Drehungsbeitrag der Sulfoxydgruppe

Verbindung	[M] _D in AcOH	Δ[M] _D	
		Sulfid <i>d,l</i> -Sulfoxyd	<i>d,l</i> -Sulfoxyd <i>d</i> -, resp. <i>l</i> -Sulfoxyd
H·Met·OH	+ 30°		
desgl., <i>d,l</i> -sulfoxyd	+ 18°	- 12°	+ 152°
desgl., <i>d</i> -sulfoxyd.	+ 170°		
Z·Met·OH	- 39°		
desgl., <i>d,l</i> -sulfoxyd	+ 10°(+ 13°) ^{a)}	+ 49° (+ 52°)	+ 148° (+ 145°)
desgl., <i>d</i> -sulfoxyd	+ 158°		
desgl., <i>l</i> -sulfoxyd	- 132°	+ 45° (+ 46°)	- 142° (- 145°)
Z·Met·OCH ₃	- 30°		
desgl., <i>d,l</i> -sulfoxyd	+ 15°(+ 16°) ^{a)}	+ 50° (+ 53°)	+ 148° (+ 145°)
desgl., <i>d</i> -sulfoxyd	+ 173°		
desgl., <i>l</i> -sulfoxyd	- 141°		
Z·Met·NHNH ₂	- 47°	+ 50° (+ 53°)	- 156° (- 157°)
desgl., <i>d,l</i> -sulfoxyd	+ 3° (+ 6°) ^{a)}		
desgl., <i>d</i> -sulfoxyd	+ 151°		
desgl., <i>l</i> -sulfoxyd	- 139°		
Z·Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met·OCH ₃ (IV)	- 263°		
desgl., Sulfoxyd durch Oxydation (Va) . .	- 157°	+ 106°	
desgl., Sulfoxyd durch Kondensation (Vb)	- 106°		
H·Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met·OH (VII)	- 97°		
desgl., <i>d,l</i> -Sulfoxyd durch Hydrolyse (VIa)	- 40°	+ 47°	
desgl., Sulfoxyd durch Oxydation (VIb) . .	- 17°		
Z = Carbobenzyoxy. Tos = Tosyl.			
a) Die in Klammern angegebenen [M] _D für <i>d,l</i> -Sulfoxyde sind die aus den experimentell sichereren Drehwerten der <i>d</i> - und <i>l</i> -Formen berechneten Daten; in den folgenden Kolonnen sind die diesen Werten entsprechenden Δ[M] _D ebenfalls in Klammern angeführt.			

Derivat wurde durch Verseifung von Carbobenzyoxy-*L*-methionin-*l*-sulfoxyd-methylester gewonnen, der seinerseits durch direkte fraktionierte Kristallisation aus dem Carbobenzyoxy-*L*-methionin-*d,l*-sulfoxyd-methylester (siehe oben) erhältlich war²³⁾. Carbobenzyoxy-*L*-methionin-*d*-sulfoxyd-methylester entstand aus Carbobenzyoxy-*L*-methionin-*d*-sulfoxyd durch Veresterung mit Diazomethan, und die Carbobenzyoxy-*L*-methionin-*d*- und -*l*-sulfoxyd-hydrazide wurden aus den entsprechenden *d*- und -*l*-Sulfoxyd-methylestern durch Hydrazinolyse gewonnen.

Aus der Zusammenstellung der molaren Drehwerte in Tabelle II geht hervor, dass die molare Drehungsdifferenz zwischen den *d,l*-Sulfoxyd- und den *d*- resp. -*l*-Sulfoxyd-Derivaten $+ 150^\circ \pm 8^\circ$, resp. $- 150^\circ \pm 8^\circ$ beträgt²⁴⁾; dieser molare

²³⁾ Weitere Beispiele für die Spaltung von diastereoisomeren Sulfoxyden durch fraktionierte Kristallisation: A. STOLL & E. SEEBECK, *Helv. 34*, 481 (1951), und Ref.²⁰⁾.

²⁴⁾ Ein Vergleich von molaren Drehungsbeiträgen ist nur unter der Voraussetzung möglich, dass alle Drehungen im gleichen Lösungsmittel gemessen werden. Wir haben für unsere Zwecke katalytisch reinen, wasserfreien Eisessig gewählt, in dem sowohl freies Methionin-sulfoxyd als auch dessen Derivate löslich sind.

Drehungsbeitrag des asymmetrischen S-Atoms entspricht dem für L-Methionin-*d*-sulfoxyd gefundenen Wert²⁵). Die relativ gute Übereinstimmung der Daten zeigt, dass der Drehungsbeitrag des asymmetrischen S-Atoms durch die Substitution der übrigen funktionellen Gruppen des Methionins kaum beeinflusst wird¹⁹).

Die Veresterung von L-Methionin-*d*-sulfoxyd durch Behandlung mit 2,5N HCl in Methanol ergab das entsprechende L-Methionin-*d*-sulfoxyd-methylester-hydrochlorid, das ca. 5% des *l*-Sulfoxyd-Derivats enthielt (Rückverseifung zum Ausgangsmaterial; siehe Tab. III). Überraschenderweise lieferte auch L-Methionin-*d*,*l*-sulfoxyd unter den obigen Reaktionsbedingungen oder bei Behandlung mit Thionylchlorid in Methanol einen an *d*-Sulfoxyd stark angereicherten Ester (Tab. III); unter den verwendeten Veresterungsbedingungen fand also eine teilweise Aufspaltung der am S-Atom racemischen *d*,*l*-Verbindung durch spontane stereospezifische Umlagerung der *l*- in die *d*-Form statt (Carbobenzoxy-L-methionin-*d*- resp. -*l*-sulfoxyd-methylester wurden unter den gleichen Bedingungen zum Carbobenzoxy-L-methionin-*d*,*l*-sulfoxyd-methylester racemisiert). Diese Begünstigung der *d*-Form des L-Methionin-sulfoxyd-methylesters entspricht der oben beschriebenen stereospezifischen Einführung des Sulfoxyd-Sauerstoffs bei der Oxydation von L-Methionin-methylester.

Tabelle III. L-Methionin-sulfoxyd-methylester-hydrochlorid

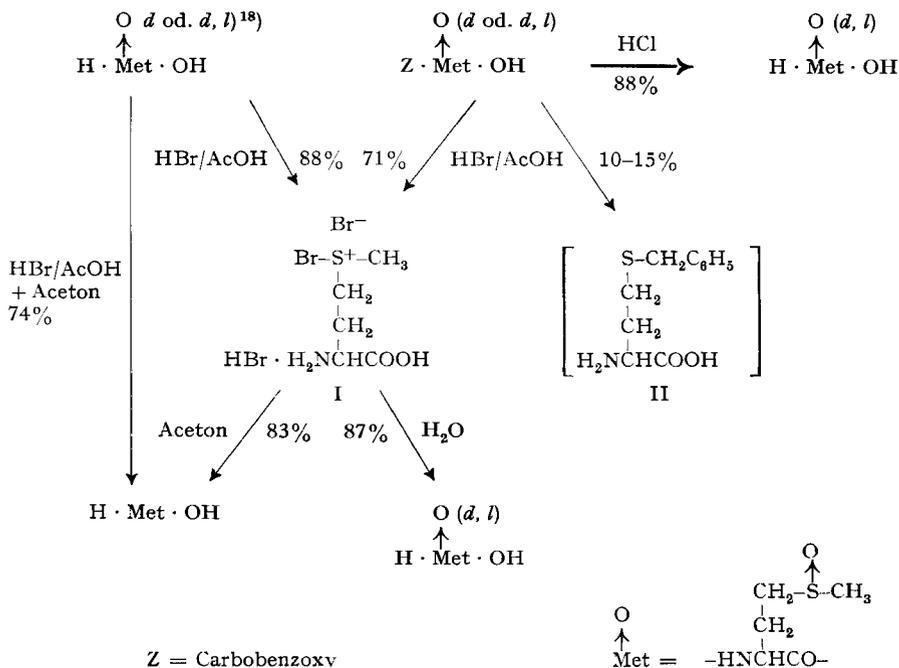
Ausgangsmaterial	Synthetische Methode	Ausbeute (%)	$[\alpha]_D^{25}$ in H ₂ O (<i>c</i> = 4)	L-Methionin-sulfoxyd aus Ester. $[\alpha]_D^{25}$ in 1N HCl (<i>c</i> = 2)
L-Methionin- <i>d</i> -sulfoxyd . . .	2,5N HCl in MeOH	78	+ 85,5°	+ 118,2°
L-Methionin- <i>d</i> , <i>l</i> -sulfoxyd . . .	desgl.	88	+ 74,3°	+ 110,4°
desgl.	1,1 Äquiv. SOCl ₂ in MeOH	82	+ 73,6°	+ 106,5°
L-Methionin-methylester, HCl	1,2 Äquiv. H ₂ O ₂ in 50% MeOH	82	+ 72,6°	+ 106,0°
Zum Vergleich: L-Methionin- <i>d</i> -sulfoxyd L-Methionin- <i>d</i> , <i>l</i> -sulfoxyd				+ 127,2° + 37,2°

Bei der Synthese von Derivaten des L-Methionin-sulfoxyds stellten wir allgemein fest, dass ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln im Vergleich zu derjenigen der entsprechenden Methionin-Derivate geringer und ihre Kristallisationstendenz dementsprechend grösser ist, eine Beobachtung, die wir im folgenden auch bei der Synthese von L-Methionin-sulfoxyd enthaltenden Peptidderivaten bestätigt fanden.

C. *Decarbenzoxylierung*. Besondere Aufmerksamkeit widmeten wir der Decarbenzoxylierung von Carbobenzoxy-L-methionin-sulfoxyd. Versuche zur hydrolytischen Abspaltung der Carbobenzoxygruppe führten nicht zum Ziel, da der Sulfoxyd-Sauerstoff teilweise reaktiv eliminiert wurde und die freiwerdende Thioäther-Funktion den Katalysator (Palladium) vor Beendigung der Reaktion vergiftete. Auch der Umsatz von L-Methionin-sulfoxyd oder dessen Carbobenzoxyderivat mit Bromwasserstoff in Eisessig verlief nicht in dem erwarteten Sinne,

²⁵) LAVINE¹⁹) gibt für L-Methionin-*d*- und -*l*-sulfoxyd molare Drehungsbeiträge von $\pm 141^\circ$ in Wasser und $\pm 153^\circ$ in 1N Salzsäure an.

sondern lieferte das bisher unbekannte S-Dibrom-L-methionin-hydrobromid (I), das einerseits durch Einwirkung von Wasser in das L-Methionin-sulfoxyd zurückgeführt wurde²⁶⁾ und andererseits bei Behandlung mit Aceton unter Bildung von Bromacetone L-Methionin lieferte. Diese Reaktionsfolge erwies sich als gute Methode für die Reduktion von L-Methionin-sulfoxyd (siehe unten), aber war für Decarbobenzoylierungen nicht befriedigend, da die einleitend erwähnte Bildung von S-Benzyl-homocystein (II) auch in diesem Falle nicht völlig unterbunden wurde.



Hingegen erwies sich die von MERRIFIELD & WOLLEY²⁷⁾ für die Decarbobenzoylierung von Strepogeninpeptiden angegebene Methode als sehr geeignet für unsere Zwecke. Die Behandlung von Carbobenzyoxy-L-methionin-*d*- oder -*d,l*-sulfoxyd mit konz. Salzsäure (1 Std. bei 40°) lieferte in ausgezeichneter Ausbeute L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd, und in der Mutterlauge liess sich kein S-Benzyl-homocystein nachweisen. Unter gleichen Bedingungen ergab die Decarbobenzoylierung von Carbobenzyoxy-L-methionin ein Gemisch bestehend aus ca. gleichen Teilen L-Methionin und S-Benzyl-homocystein. Der Schutz der Thioäther-Funktion des Carbobenzyoxy-L-methionins in Form des Sulfoxyds unterbindet also bei der Decarbobenzoylierung mit konz. Salzsäure vollständig die Bildung des unerwünschten Nebenprodukts S-Benzyl-homocystein. Die bei dieser Reaktion gleichzeitig erfolgende Racemi-

²³⁾ Ähnliche Reaktionen sind bei der Behandlung von aromatischen und araliphatischen Sulfoxyden mit HBr in organischen Lösungsmitteln beobachtet worden; siehe z. B. TH. ZINCKE & P. JÖRG, Ber. deutsch. chem. Ges. 42, 3362 (1909); F. FROMM & G. RAIZISS, Liebigs Ann. Chem. 374, 90 (1910); K. FRIES & W. VOGT, *ibid.* 381, 337 (1911); E. FROMM, *ibid.* 396, 75 (1913).

²⁷⁾ R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 4646 (1956).

sierung am asymmetrischen S-Atom ist, wie unten gezeigt wird, bei Peptidsynthesen belanglos.

D. *Eliminierung des Sulfoxyd-Sauerstoffs*. Die im Hinblick auf Peptidsynthesen sehr wichtige Eliminierung des Sulfoxyd-Sauerstoffs unter Rückbildung der Thioäther-Funktion des Methionins ergab bei Verwendung der bisher vorgeschlagenen Reduktionsmittel wie Natriumpyrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)²⁸⁾ 29), Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) oder Schwefelwasserstoff²⁹⁾ unbefriedigende Resultate, da einerseits die Abtrennung der als Reduktionsmittel verwendeten Salze zu Komplikationen führte und andererseits (besonders mit H_2S) die Reduktion relativ langsam verlief (Tab. IV). Auch die katalytische Hydrierung in Gegenwart von Palladium oder RANEY-Nickel²⁹⁾ erwies sich als ungeeignet (siehe Exper. Teil); durch Natrium in flüssigem Ammoniak wurde L-Methionin-sulfoxyd nicht verändert.

Viel leichter gelang die reduktive Abspaltung des Sulfoxyd-Sauerstoffs mittels milder organischer Reduktionsmittel, wie Thioglykolsäure³⁰⁾ oder Thioglykol. Bei Verwendung von 2,5 bis 5 Äquivalenten wässriger Thioglykolsäure wurde L-Methionin-sulfoxyd relativ rasch und quantitativ zu papierchromatographisch reinem L-Methionin reduziert; in Gegenwart von Methanol oder bei Verwendung von Thioglykol verlief die Reduktion etwas langsamer (Tab. IV).

Tabelle IV. *Reduktion von L-Methionin-d,L-sulfoxyd*

Reagens	Reaktionsbedingungen ^{a)}	Reaktionszeit (Std. bei 50°)	Verhältnis (%)		Isoliert (%)
			Sulfoxyd	Methionin	
HSCH_2COOH	2,5 Äquiv. in H_2O	5	20	80	85 ^{a)}
	desgl.	24	0	100	
	5 Äquiv. in H_2O	5	5	95	
	desgl.	8	0	100	
	5 Äquiv. in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1	5	30	70	
desgl.	24	5	95		
$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	2,5 Äquiv. in H_2O	5	70	30	82 ^{a)}
	desgl.	24	20	80	
	5 Äquiv. in H_2O	5	40	60	
	desgl.	24	Spuren	~100	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	2,5 Äquiv. in H_2O	5	40	60	
	desgl.	24	5	95	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	2,5 Äquiv. in H_2O	5	50	50	
	desgl.	24	10	90	
H_2S	in Lösung eingeleitet	5	>95	<5	
		24	90	10	

^{a)} Vgl. Exper. Teil.

²⁸⁾ F. MICHEEL & H. SCHMITZ, Ber. deutsch. chem. Ges. 72, 992 (1939).

²⁹⁾ A. STOLL & E. SEEBECK, Helv. 37, 189 (1948).

³⁰⁾ Vgl. M. L. DEDMAN, T. H. FARMER & C. J. MORRIS, Biochem. J. 66, 166 (1957); J. I. HARRIS & P. ROOS, *ibid.* 71, 434 (1959): «Discussion», S. 442.

Auch die bei der Einwirkung von Bromwasserstoff auf Sulfoxyde beobachteten Reaktionen (siehe Reaktionsschema) liessen sich für eine Methode zur Freisetzung der Thioäther-Funktion auswerten. Bei Behandlung von L-Methionin-sulfoxyd mit Bromwasserstoff in einem Gemisch Eisessig/Aceton erfolgte innert weniger Minuten eine vollständige Abspaltung des Sulfoxyd-Sauerstoffs unter Bildung von papierchromatographisch reinem L-Methionin.

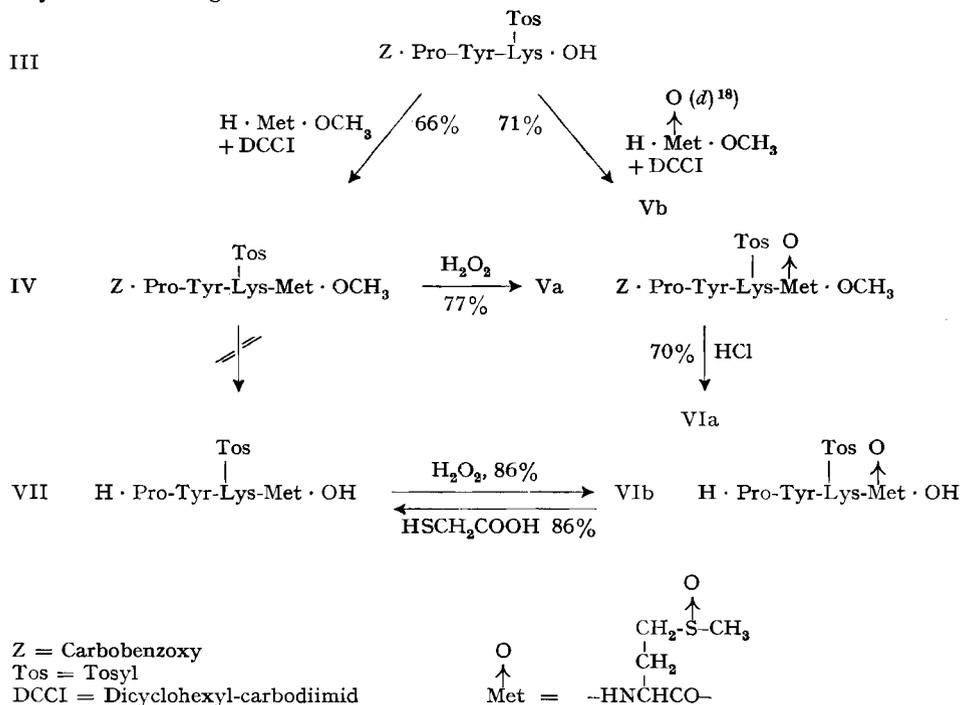
Auf Grund der mit L-Methionin-sulfoxyd und seinen einfachsten Derivaten gewonnenen Erfahrungen über die Einführung des Sulfoxyd-Sauerstoffs, die Decarboxylierung von Carbobenzoxy-L-methionin-sulfoxyd und die Freisetzung der Thioäther-Gruppe aus dem Sulfoxyd überprüften wir im folgenden die Anwendbarkeit der Methode bei der Synthese eines höheren Peptids.

E. *Synthese von H-Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met-OH (VII)*. Im Laufe unserer Arbeiten über die Synthese von geschützten Polypeptidsequenzen des β -Melanophorenstimulierenden Hormons des Rindes¹¹⁾ hatten wir versucht, den durch Kondensation von Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (III) (erhalten durch Verseifung des entsprechenden Methylesters¹¹⁾) mit L-Methionin-methylester in Gegenwart von Dicyclohexyl-carbodiimid gewonnenen Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin-methylester (IV), der – im Gegensatz zum entsprechenden tert.-Butyloxycarbonyl-Derivat¹¹⁾ – in fester Form isolierbar war, in das Tetrapeptidderivat VII überzuführen. Alle unsere Versuche zur Decarboxylierung von IV schlugen jedoch fehl; selbst bei Verwendung der von GUTTMANN & BOISSONNAS vorgeschlagenen Zusätze an Methyl-äthyl-sulfid und Diäthylphosphit³⁾¹⁰⁾ entstand bei der Decarboxylierung mit Bromwasserstoff in Eisessig ein schwer trennbares Gemisch, das neben dem erwarteten Reaktionsprodukt 20–30% eines nicht näher untersuchten Nebenprodukts enthielt.

In Anbetracht dieser Schwierigkeiten untersuchten wir den Weg über die L-Methionin-sulfoxyd-Verbindungen V und VI. Die Einführung des Sulfoxyd-Sauerstoffs erfolgte auch in diesem Falle sehr leicht: aus einer alkoholischen Lösung des rohen Carbobenzoxy-tetrapeptidesters IV kristallisierte nach Zugabe von Hydrogenperoxyd direkt das L-Methionin-sulfoxyd-peptidderivat Va, das einen gegenüber dem Ausgangsmaterial um ca. 100° höheren, scharfen Schmelzpunkt zeigte und wahrscheinlich die *d*-Sulfoxyd-Form angereichert enthielt (molare Drehungsänderung + 106° im Vergleich zum Wert + 49° ± 5°, der für die in Tabelle II angeführten L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd-Derivate gefunden wurde). Die Kondensation von Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (III) mit dem durch Veresterung von L-Methionin-*d*-sulfoxyd erhaltenen Methylester (ca. 95% *d*- und 5% *l*-Sulfoxyd, siehe oben) in Gegenwart von Dicyclohexyl-carbodiimid lieferte die L-Methionin-sulfoxyd-Verbindung Vb in der (entsprechend der molaren Drehungsdifferenz von + 157°, Tab. II) das asymmetrische S-Atom hauptsächlich die *d*-Konfiguration aufwies.

Die Decarboxylierung und gleichzeitige Verseifung von Va oder b durch Behandlung mit konz. Salzsäure (1 Std. bei 40°) ergab das reine L-Methionin-sulfoxyd-tetrapeptidderivat VIa als *d,l*-Sulfoxyd (Übereinstimmung der molaren Drehungsdifferenz von + 47° mit den für einfachere Verbindungen gefundenen Werten von + 49° ± 5°; siehe Tab. II). Die gleiche Verbindung entstand unter schwacher Anreicherung der *d*-Sulfoxyd-Form VIb (molare Drehungsdifferenz + 80°) durch Oxy-

dition des Tetrapeptidderivats VII mit Hydrogenperoxyd in Eisessig. Schliesslich führte die Reduktion von VI a oder b mit überschüssiger Thioglykolsäure (10 Äquivalente) zum Tetrapeptidderivat VII, das mit der früher beschriebenen Substanz¹¹⁾ in jeder Beziehung identisch war.



Die Decarbobenzylierung des Carbobenzyloxy-tetrapeptidesters IV, die auf direktem Wege nicht möglich war, gelang somit über die L-Methionin-sulfoxyd-peptidderivate V und VI, wobei im Gegensatz zum früher verfolgten Syntheseweg¹¹⁾, alle Zwischenprodukte in kristalliner Form erhalten wurden. Die Reaktionsfolge zeigt ferner, dass der Konfiguration am S-Atom – obwohl interessant vom theoretischen Standpunkt – bei Peptidsynthesen praktisch keine Bedeutung zukommt. Die Methode der temporären Blockierung der Thioäther-Funktion des Methionins, die auf jeder beliebigen Stufe einer Synthese erfolgen kann, sollte sich somit auch auf die Synthese von anderen Methioninpeptiden übertragen lassen.

Experimenteller Teil

Die Smp. sind in einer Kapillare im Heizbad bestimmt und nicht korrigiert.

Papierchromatographie (PCG): auf WHATMAN-Papier Nr. 3, absteigend in den Systemen: I = tert.-Amylalkohol (100 ml), Isopropanol (40 ml), Wasser (50 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Diäthylbarbitursäure (1,8 g); II = sek.-Butanol (70 ml), Isopropanol (10 ml), Wasser (40 ml), Monochloressigsäure (3 g); III = sek.-Butanol (100 ml), Isopropanol (15 ml) Wasser (70 ml), Diäthylbarbitursäure-Na-Salz (0,5 g); IV = sek.-Butanol (35 ml), Isopropanol (35 ml), Wasser (25 ml), Phosphatpuffer 1,5M, pH 8 (10 ml); V = n-Butanol (100 ml), Aceton (100 ml), Wasser (50 ml), Diäthylamin (20 ml); VI = Collidin (100 ml), Lutidin (100 ml) gesättigt mit Wasser. Anfärbung mit Ninhydrin, bei Anwesenheit von Tyrosin auch mit PAULY-Reagens.

A. Eigenschaften und Reaktionen des Methionin-sulfoxyds

L-Methionin-dl-sulfoxyd. – a) Herstellung durch Behandlung von *L*-Methionin, $[\alpha]_D^{27} = +19,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,5$ in Eisessig), mit 1,2 Äquiv. Hydrogenperoxyd, in Salzsäure/Methanol, entsprechend den Literaturangaben^{12,19}). Der Verlauf dieser sowie aller folgenden Oxydationen ist durch jodometrische Bestimmung des überschüssigen H_2O_2 verfolgt worden: je 0,1 ml der Reaktionslösung werden in geeigneten Intervallen mit 0,25 ml einer frisch hergestellten 1*N*-Lösung von KJ in 1*N* H_2SO_4 versetzt und das ausgeschiedene Jod wird nach 2 Min. titrimetrisch mit 0,02*N* $Na_2S_2O_3$ -Lösung bestimmt. Nach 3 Std. ist der H_2O_2 -Gehalt der Reaktionslösung konstant und der Ansatz wird aufgearbeitet¹²). Die Substanz zeigt $[\alpha]_D^{27} = 11,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Eisessig), $+37,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,1$ in 1*N* HCl). Die Rf-Werte in den Systemen I 0,17, II 0,35, III 0,32, IV 0,36, V 0,23 und VI 0,19 sind deutlich verschieden von denjenigen des Methionins (I 0,42, II 0,61, III 0,56, IV 0,60, V 0,53, VI 0,42).

b) Oxydation in Eisessig¹³): Eine Suspension von 1,49 g (10 mMol) *L*-Methionin in 30 ml Eisessig wird bei ca. 10° mit 1,33 ml (12 mMol) 30-proz. Hydrogenperoxyd (9*N*-Lösung) versetzt und bei Zimmertemperatur geschüttelt; nach 20 Min. ist das Ausgangsmaterial gelöst und nach 60 Min. die Reaktion beendet (jodometrische Bestimmung von H_2O_2). Die Lösung wird bei max. 40° im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus Wasser/Aceton umkristallisiert: 1,59 g (96%); papierchromatographisch einheitlich.

c) Oxydationen mit überschüssigem Hydrogenperoxyd: Je 15 mg (0,1 mMol) *L*-Methionin werden in 0,25 ml dor in Tabelle I angegebenen Reaktionslösungen bei Zimmertemperatur stehengelassen; nach den angegebenen Zeiten werden je 0,1 ml-Lösung bei 0,1 Torr und 25° eingedampft; der Rückstand wird in 0,1 ml Wasser gelöst und sofort papierchromatographisch im System V auf das ungefähre Verhältnis von Sulfoxyd und Sulfon geprüft (Rf-Werte des *L*-Methionin-sulfoxyds: s. unten); in keinem der Versuche liess sich unoxydiertes Methionin nachweisen.

L-Methionin-d-sulfoxyd. Herstellung aus dem *d,l*-Sulfoxyd durch Aufspaltung der diastereoisomeren Pikrate¹⁹). Nach Umkristallisieren aus Wasser/Aceton: $[\alpha]_D^{24} = +102,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,6$ in Eisessig), $+127,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in 1*N* HCl); einheitlich in den Systemen I–IV (gleiche Rf-Werte wie *d,l*-Sulfoxyd). Das IR.-Spektrum (Nujolpaste) entspricht im Bereich von 2,5–9 μ weitgehend demjenigen des Methionins, zeigt aber zusätzlich die Sulfoxyd-Absorption mit 2 Maxima bei 9,74 und 9,87 μ .

Die Drehung und die papierchromatographische Einheitlichkeit bleiben unverändert bei Behandlung mit 1*N* HCl (24 Std. bei 25°) und 1*N* NaOH (4 Std. bei 50°); nach Einwirkung von konz. HCl (1 Std. bei 40°) zeigt das isolierte (Ausbeute 91%) papierchromatographisch reine *L*-Methionin-*d,l*-sulfoxyd: $[\alpha]_D^{27} = +34,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in 1*N* HCl) (vollständige Racemisierung am asymmetrischen S-Atom); nach längerem Erhitzen mit konz. HCl lässt sich papierchromatographisch die Bildung von Methionin, aber von keinen weiteren Nebenprodukten nachweisen.

L-Methionin-sulfon. Die Oxydation von *L*-Methionin mit Hydrogenperoxyd in Gegenwart von Ammoniummolybdat unter den für das DL-Methioninderivat angegebenen Bedingungen¹⁸) ergibt das Sulfon in 82% Ausbeute; nach Umkristallisieren aus Wasser: $[\alpha]_D^{28} = +30,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in 1*N* HCl), $+13,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Wasser); IR.-Spektrum (Nujolpaste): Sulfon-Banden bei 7,88 und 8,92 μ .

$C_5H_{11}O_4NS$ (181,2) Ber. C 33,14 H 6,12 O 35,32% Gef. C 33,18 H 6,26 O 35,03%

Die Substanz zeigt in den meisten Lösungsmittelsystemen die gleichen Rf-Werte wie das *L*-Methionin-sulfoxyd, ausser in V 0,33 und VI 0,31.

Reduktion von L-Methionin-d,l-sulfoxyd. – a) mit Thioglykolsäure: Eine Lösung von 330 mg (2 mMol) Methionin-*d,l*-sulfoxyd in 5 ml Wasser wird mit 0,70 ml (10 mMol) frisch destillierter Thioglykolsäure versetzt, in N_2 -Atmosphäre 8 Std. bei 50° stehengelassen, darauf zweimal mit wenig Essigester extrahiert und im Vakuum auf ca. 1 ml eingengt. Nach Zugabe von 10 ml Äthanol werden 254 mg (85%) papierchromatographisch reines *L*-Methionin erhalten. Die eingedampften Essigester-Auszüge liefern nach Umkristallisieren des festen Rückstandes aus Äther/Petroläther 170 mg (93%) Dithiodiglykolsäure (Oxydationsprodukt der Thioglykolsäure) vom Smp. 106–108°; Literaturwert: 108–109°.

b) mit Thioglykol: Die Reduktion mittels frisch destilliertem Thioglykol (5 Äquivalente) unter den obigen Bedingungen liefert nach 24 Std. 246 mg (82%) reines *L*-Methionin.

c) Die in Tabelle IV zusammengestellten Versuche sind unter den gleichen Bedingungen durchgeführt worden; nach den angegebenen Reaktionszeiten wurde je 0,1 ml Reaktionslösung entnommen und sofort papierchromatographisch in den Systemen I und II auf das ungefähre Verhältnis von Methionin-sulfoxyd und Methionin geprüft.

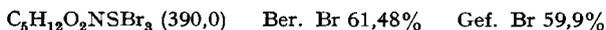
d) Katalytisch mit Palladium: 330 mg (2 mMol) L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd werden in 10 ml 60-proz. Methanol gelöst und in Gegenwart von 0,2 g Palladiumkohle (10% Pd) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert. Die anfänglich rasche Wasserstoffaufnahme verlangsamt sich nach 30 Min. und kommt nach 20 Std. zum Stillstand (H_2 -Aufnahme: 45 ml). Der nach dem Eindampfen der filtrierten Lösung erhaltene Rückstand liefert beim Verreiben mit Aceton 280 mg farbloses Pulver, das aus ca. gleichen Teilen L-Methionin und L-Methionin-sulfoxyd besteht (PCG in den Systemen I und II).

e) Katalytisch mit RANEY-Nickel: Die Reduktion in Gegenwart von 0,5 g RANEY-Nickel bei 40° (sonst gleiche Bedingungen wie oben) verläuft äusserst langsam und liefert nach 20 Std. (H_2 -Aufnahme 42 ml) ein Gemisch, das aus ca. 70% Methionin, 20% α -Aminobuttersäure (Rf-Werte in Syst. I 0,25, II 0,49) und 10% einer nicht identifizierten Substanz (Rf-Wert in I 0,41; rote Färbung mit Ninhydrin) besteht; L-Methionin-sulfoxyd ist nicht nachweisbar (PCG in Systemen I und II).

f) Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak: 330 mg (2 mMol) L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd werden in ca. 10 ml flüssigem Ammoniak gelöst und unter Rühren portionenweise mit 60 mg (2,5 mMol) Natrium versetzt. Nach vollständiger Entfärbung der anfänglich blauen Lösung werden 2 g Dowex 50-X8 Ionenaustauscher (Ammonium-Form) zugefügt und das nach Verdampfen des Ammoniaks erhaltene Gemisch wird mehrmals mit wenig Wasser extrahiert. Die im Vakuum eingedampften wässrigen Extrakte ergeben nach Verrühren des Rückstandes mit Aceton 305 mg (92%) papierchromatographisch (Systeme I und II) reines L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd. – Bei Zugabe von 140 mg (6 mMol) Natrium unter sonst gleichen Bedingungen lassen sich im Reaktionsprodukt Spuren von α -Aminobuttersäure (Rf-Werte: siehe oben) und ca. 5% einer Substanz mit den Rf-Werten I 0,06, II 0,24 (ev. Homocystein) nachweisen.

g) Reduktion mittels Bromwasserstoff in Gemisch Eisessig/Aceton: siehe folgender Abschnitt.

S-Dibrom-L-methionin-hydrobromid (I). Eine Suspension von 330 mg (2 mMol) L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd in 1,5 ml Eisessig wird mit 2 ml einer 5N-Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt und mechanisch geschüttelt. Das Ausgangsmaterial geht innert ca. 10 Min. in Lösung, und gleichzeitig scheiden sich aus dem stark braun gefärbten Reaktionsgemisch gelbe Kristalle aus. Nach 60 Min. wird die überstehende Lösung abdekantiert, das kristalline Material mehrmals mit Eisessig gewaschen, unter möglichstem Feuchtigkeitsausschluss abfiltriert, mit Äther gewaschen und bei 0,1 Torr getrocknet: 0,69 g (88%) hygroskopische gelbe Kristalle vom Smp. 122–125° (unter starker Zersetzung).



Die Verbindung ist bei 0° über mehrere Monate beständig, zersetzt sich aber rasch bei Zimmertemperatur; schwer löslich in Äther, Benzol, Essigester, Chloroform, Dioxan und Acetonitril; löslich in Methanol und Äthanol, langsame Entfärbung der braunen Lösung; leicht löslich in Aceton und Wasser unter sofortiger Entfärbung.

Überführung in L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd: 195 mg (0,5 mMol) *S-Dibrom-L-methionin-hydrobromid* werden in 1 ml Wasser gelöst und 20 Min. bei Zimmertemperatur stengelassen. Die farblose Lösung wird darauf mit Amylamin neutralisiert und mit 10 ml Aceton versetzt, wobei sich das L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd als farbloses Kristallpulver abscheidet: 72 mg (87%); $[\alpha]_D^{27} = +39,4 \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in 1N HCl); papierchromatographisch einheitlich.

Überführung in L-Methionin: 195 mg (0,5 mMol) der Bromverbindung werden in 1 ml Aceton gelöst und nach 10 Min. mit 10 ml Äther versetzt. Das ausgeschiedene Öl kristallisiert beim Animpfen mit L-Methionin-hydrobromid; nach 30 Min. wird die überstehende Lösung (stechender Geruch von Bromaceton) abdekantiert, das kristalline Material mehrmals mit Äther gewaschen, in 0,5 ml Wasser gelöst und die Lösung mit Amylamin neutralisiert. Bei Zugabe von 5 ml Äthanol scheiden sich 62 mg (82%) L-Methionin aus, das nur Spuren von L-Methionin-sulfoxyd enthält (PCG in Systemen I und II).

Direkte Reduktion von L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd mit Bromwasserstoff im Gemisch Eisessig/Aceton: 330 mg (2 mMol) fein pulverisiertes L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd werden in 5 ml Aceton

suspendiert und bei 0° mit 2 ml einer 5*N*-Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt. Das gelb gefärbte Reaktionsgemisch wird bis zur vollständigen Lösung des Ausgangsmaterials geschüttelt (3 Min.), weitere 2 Min. stehengelassen (bis farblos) und sofort im Vakuum bei max. 30° eingedampft. Der kurz bei 0,1 Torr getrocknete Rückstand wird in 1 ml Aceton aufgenommen und die Lösung mit 10 ml Äther versetzt, wobei kristallines L-Methionin-hydrobromid ausfällt, das wie oben in freies L-Methionin übergeführt wird: 221 mg (74%); papierchromatographisch einheitlich in den Systemen I, II und V. – Die direkte Reduktion lässt sich auch durch kurzes Einleiten von trockenem Bromwasserstoff in eine Suspension von L-Methionin-*d*,*l*-sulfoxyd in Aceton durchführen (Ausbeute 72%), doch erschweren die dabei gebildeten Kondensationsprodukte des Acetons die Anfarbung.

B. Derivate des L-Methionin-sulfoxyds

Carbobenzoxy-L-methionin-d,l-sulfoxyd. – a) Aus Carbobenzoxy-L-methionin: 1,42 g (5 mMol Carbobenzoxy-L-methionin⁷⁾), $[\alpha]_D^{24} = -13,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,2$ in Eisessig), $-16,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,2$ in Äthanol) werden in 24 ml Eisessig gelöst, mit 6 ml einer frisch hergestellten 1*N*-Lösung von Hydrogenperoxyd in Essigsäure (Lösung hergestellt durch Verdünnen von 30-proz. Hydrogenperoxyd mit Eisessig und jodometrische Titration des H₂O₂-Gehalts) versetzt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach 30 Min. ist die Reaktion beendet (H₂O₂-Gehalt konstant; vgl. L-Methionin-*d*,*l*-sulfoxyd), und die Lösung wird im Vakuum bei max. 40° eingedampft. Der ölige Rückstand erstarrt nach mehrmaligem Verrühren mit Äther bei 0°: 1,23 g (82%), Smp. ca. 90°; nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester resp. Aceton/Äther: Smp. 97–100° (nach Sintern bei ca. 90°); $[\alpha]_D^{28} = +3,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Äthanol).

$C_{13}H_{17}O_5NS$ (299,4)	Ber. C 52,16	H 5,72	N 4,68	O 26,72%
	Gef. „ 52,05	„ 5,78	„ 4,65	„ 26,98%

b) Aus L-Methionin-*d*,*l*-sulfoxyd: Eine Lösung von 5,0 g (30 mMol) L-Methionin-*d*,*l*-sulfoxyd in 7,5 ml 4*N* NaOH wird unter Rühren bei ca. 5° tropfenweise mit 6,0 g (35 mMol) Carbobenzoxychlorid versetzt, und gleichzeitig werden 7,5 ml 4*N* NaOH mit solcher Geschwindigkeit zugetropft, dass der pH-Wert der Lösung ständig zwischen 8 und 9 liegt (Reaktionszeit 15 Min.). Die Reaktionslösung wird weitere 30 Min. bei ca. 5° und 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt, darauf mit Äther extrahiert und bei 0° mit konz. HCl angesäuert. Das ausgeschiedene Öl wird in Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Beim Verreiben des Rückstands mit Essigester/Äther bei 0° tritt langsame Kristallisation ein; isoliert: 7,44 g (83%), Smp. 93–96° (nach Sintern bei ca. 85°); identisch mit dem nach a) hergestellten Material. Beim Umkristallisieren aus Aceton-Äther tritt in einzelnen Fällen eine Anreicherung der *l*-Sulfoxyd-Verbindung (s. unten) ein; z. B. Smp. 104–106°; $[\alpha]_D^{28} = -16,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Äthanol).

Carbobenzoxy-L-methionin-d-sulfoxyd. L-Methionin-*d*-sulfoxyd wird unter den oben angegebenen Bedingungen carbobenzoxyliert und das Reaktionsprodukt nach Ansäuern der mit Äther extrahierten Reaktionslösung direkt in kristalliner Form isoliert: Smp. 63–65° (Hydrat); nach Umkristallisieren aus Aceton/Äther, Smp. 112–114°; $[\alpha]_D^{27} = +52,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Eisessig), $+48,1^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Äthanol). Ausbeute 74%.

$C_{13}H_{17}O_5NS$ (299,4)	Ber. C 52,16	H 5,72	N 4,68	S 10,71%
	Gef. „ 52,26	„ 5,68	„ 4,71	„ 10,66%

Das IR.-Spektrum (CH₂Cl₂) ist ähnlich demjenigen des Carbobenzoxy-L-methionins, zeigt aber zusätzlich die Sulfoxyd-Bande bei 9,9 μ.

Carbobenzoxy-L-methionin-l-sulfoxyd. 313 mg (1 mMol) Carbobenzoxy-L-methionin-*l*-sulfoxyd-methylester (s. unten) werden in 1,2 ml 1*N* NaOH suspendiert und nach 30 Min. wird die klare Lösung schwach angesäuert. Das ausgeschiedene ölige Material kristallisiert rasch beim Verreiben bei 0°; abfiltriert und mit Wasser gewaschen: 263 mg (88%), Smp. 115–117°; umkristallisiert aus Essigester/Äther: 239 mg, Smp. 117–119°; $[\alpha]_D^{25} = -43,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Eisessig), $-47,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Äthanol).

$C_{13}H_{17}O_5NS$ (299,4)	Ber. C 52,16	H 5,72	N 4,68%	Gef. C 52,11	H 5,67	N 4,57%
-----------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

Decarbobenzoxylierung von Carbobenzoxy-L-methionin-d-sulfoxyd. – a) Mittels konz. Salzsäure: 300 mg (1 mMol) der Carbobenzoxyverbindung werden in 3 ml konz. HCl gelöst und 1 Std. bei

40° stehengelassen (CO₂-Entwicklung und Abscheidung von Benzylchlorid als Öl). Das Reaktionsgemisch wird bei 0,1 Torr und max. 40° eingedampft, der Rückstand von überschüssiger Salzsäure befreit (2 Std. bei 0,1 Torr über KOH), in 3 ml Wasser gelöst und die Lösung zur Entfernung des restlichen Benzylchlorids mit Essigester extrahiert. Die wässrige Lösung liefert nach Neutralisieren mit Amylamin und Zugabe von 20 ml Aceton 145 mg (88%) papierchromatographisch einheitliches L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd; $[\alpha]_D^{26} = +33,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,0$ in 1N HCl); in der Mutterlauge lassen sich Spuren von Methionin, aber kein S-Benzyl-homocystein nachweisen (PCG in den Systemen I und II).

Die Decarboxylierung von Carbobenzyloxy-L-methionin unter gleichen Bedingungen ergibt ein Gemisch bestehend aus ca. gleichen Teilen Methionin und S-Benzyl-homocystein (Rf-Werte in I 0,33, in II 0,47).

b) Mittels Bromwasserstoff in Eisessig: Eine Suspension von 300 mg (1 mMol) Carbobenzyloxy-L-methionin-*d,l*-sulfoxyd in 0,5 ml Eisessig wird mit 1,5 ml einer 5N-Lösung von HBr in Eisessig versetzt (CO₂-Entwicklung) und nach 1 Std. wird das ausgeschiedene S-Dibrom-L-methioninhydrobromid isoliert: 280 mg (71%), Smp. 118–122° (Zers.). Die Mutterlauge enthält, nach Behandlung mit Wasser, neben L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd, 10–15% S-Benzyl-homocystein (Rf-Werte: siehe oben). – Die isolierte Bromverbindung liefert beim Umsatz mit Wasser 70% papierchromatographisch reines L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd.

Carbobenzyloxy-L-methionin-d,l- und -l-sulfoxyd-methylester. – a) Aus Carbobenzyloxy-L-methionin-methylester: Eine Lösung von 0,75 g (2,5 mMol) Carbobenzyloxy-L-methionin-methylester³¹⁾ in 5 ml Methanol wird mit 0,35 ml 30-proz. Hydrogenperoxyd (3 mMol) versetzt, 20 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen und darauf im Vakuum bei max. 25° zum Sirup eingeeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, die Lösung bei 0° mit 1N HCl, 1N NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Öl kristallisiert beim Verreiben mit Petroläther und ergibt 0,70 g (88%) der *d,l*-Sulfoxyd-Verbindung; Smp. unscharf bei 67–76°; $[\alpha]_D^{25} = +4,9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-15,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,0$ in Äthanol). Zweimaliges Umkristallisieren aus Essigester-Äther liefert 262 mg (33%) Carbobenzyloxy-L-methionin-*l*-sulfoxyd-methylester vom Smp. 107–108°; $[\alpha]_D^{25} = -45,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-64,0^\circ$ ($c = 2,1$ in Äthanol).

C₁₄H₁₉O₅NS (313,4) Ber. C 53,66 H 6,11 N 4,47% Gef. C 53,64 H 6,28 N 4,43%

b) Aus Carbobenzyloxy-L-methionin-*d,l*-sulfoxyd: 3,0 g (10 mMol) der Carbobenzyloxy-Verbindung werden in 30 ml Methanol gelöst und unter Umschütteln portionenweise mit einer Lösung von Diazomethan in Äther bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Entfärbung mit einigen Tropfen Eisessig wird die Lösung im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Lösung bei 0° in üblicher Weise neutral gewaschen und im Vakuum eingedampft. Die *d,l*-Sulfoxyd-Verbindung kristallisiert langsam aus Äther (2,79 g; 89%) und liefert beim Umkristallisieren aus Essigester/Äther das oben beschriebene *l*-Sulfoxyd-Derivat. In den aus der Mutterlauge isolierten Kristallfraktionen ist die *d*-Form angereichert: $[\alpha]_D^{27} = +15^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,2$ in Äthanol).

Carbobenzyloxy-L-methionin-d-sulfoxyd-methylester. 6,0 g (20 mMol) Carbobenzyloxy-L-methionin-*d*-sulfoxyd werden mit Diazomethan unter den obigen Bedingungen verestert und das Reaktionsprodukt wird aus Essigester/Äther kristallisiert: 5,06 g (81%), Smp. 75–77°; zur Analyse aus Essigester/Äther umkristallisiert: Smp. 77–78°; $[\alpha]_D^{27} = +55,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Eisessig), $+42,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Äthanol).

C₁₄H₁₉O₅NS (313,4) Ber. C 53,66 H 6,11 O 25,53% Gef. C 53,76 H 6,15 O 25,81%

Durch Verseifung mit 1,2 Äquiv. Natronlauge in Methanol wird Carbobenzyloxy-L-methionin-*d*-sulfoxyd in 93% Ausbeute zurückgewonnen; $[\alpha]_D^{25} = +47,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Äthanol).

Die Behandlung des Carbobenzyloxy-L-methionin-*d*- oder -*l*-sulfoxyd-methylesters mit einer 2,5N-Lösung von Chlorwasserstoff in Methanol (24 Std. bei 25°) liefert den Carbobenzyloxy-L-methionin-*d,l*-sulfoxyd-methylester: $[\alpha]_D^{27} = -16^\circ$ resp. $-16,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,5$ in Äthanol).

³¹⁾ Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther/Petroläther: Smp. 41–43°; $[\alpha]_D^{26} = -10,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-31,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Methanol); C₁₄H₁₉O₄NS (297,4), Ber. C 56,55, H 6,44, N 10,78%; Gef. C 56,49, H 6,43, N 10,78%.

Carbobenzoxy-L-methionin-dl-sulfoxyd-hydrazid. - a) Aus Carbobenzoxy-L-methionin-hydrazid⁹⁾, $[\alpha]_D^{25} = -15,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Eisessig), $-17,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol), durch Behandlung mit 1,2 Äquiv. 30-proz. Hydrogenperoxyd in Methanol. Kristallisation aus Essigester liefert 91% Hydrazid vom Smp. 147–155° nach Sintern bei 125°; $[\alpha]_D^{25} = +1,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Eisessig), $-3,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Äthanol); bei mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol wird das *l*-Sulfoxyd-Derivat (siehe unten) angereichert: Smp. 171–173° (nach Sintern bei 165°); $[\alpha]_D^{25} = -33,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$ in Eisessig).

$C_{13}H_{19}O_4N_3S$ (313,4) Ber. C 49,82 H 6,11 N 13,41% Gef. C 49,72 H 5,98 N 13,61%

b) Aus Carbobenzoxy-L-methionin-*d*,*l*-sulfoxyd-methylester: 157 mg (0,05 mMol) roher Ester werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 0,1 ml Hydrazinhydrat versetzt und 24 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Lösung wird darauf im Vakuum eingedampft, der Rückstand bei 0,1 Torr über konz. H_2SO_4 von überschüssigem Hydrazin befreit und mehrmals mit Essigester gewaschen; isoliert: 141 mg (90%); $[\alpha]_D^{28} = +0,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Eisessig), $-2,6^\circ$ ($c = 2,2$ in Äthanol); identisch mit dem nach a) hergestellten Hydrazid.

Carbobenzoxy-L-methionin-d-sulfoxyd-hydrazid. Herstellung durch Umsatz von Carbobenzoxy-L-methionin-*d*-sulfoxyd-methylester mit Hydrazinhydrat unter den oben angegebenen Bedingungen. Das Hydrazid kristallisiert grösstenteils (72%) direkt aus der Reaktionslösung; nach Aufarbeitung der Mutterlauge lässt sich weiteres Material (8%) isolieren. Nach Umkristallisieren aus Alkohol: Smp. 154–156°; $[\alpha]_D^{27} = +48,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Eisessig), $+45,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{13}H_{19}O_4N_3S$ (313,4) Ber. C 49,82 H 6,11 N 13,41% Gef. C 49,49 H 6,39 N 13,32%

Carbobenzoxy-L-methionin-l-sulfoxyd-hydrazid. Beim Umsatz von Carbobenzoxy-L-methionin-*l*-sulfoxyd-methylester mit Hydrazinhydrat beginnt nach 7 Std. die Kristallisation des Hydrazids, das nach 24 Std. isoliert wird (Ausbeute 79%); umkristallisiert aus Alkohol: Smp. 176–178°; $[\alpha]_D^{28} = -44,5^\circ \pm 0,1^\circ$ ($c = 1,9$ in Eisessig); Gef. C 49,80, H 6,22, N 13,44%.

L-Methionin-d-sulfoxyd-methylester. - a) *Hydrochlorid*: 8,25 g (50 mMol) *L*-Methionin-*d*-sulfoxyd werden in 150 ml einer 2,5*N*-Lösung von Chlorwasserstoff in Methanol gelöst und 24 Std. bei 25° stehengelassen. Das Lösungsmittel wird darauf im Vakuum abgedampft, der ölige Rückstand zweimal mit Äther verrieben und bei 0,1 Torr über KOH von überschüssigem Chlorwasserstoff befreit (1 Std. bei Zimmertemperatur); aus einer konzentrierten Lösung des erhaltenen Öls in Methanol kristallisiert nach Zugabe von Essigester bis zu Trübung und Animpfen (Impfkristalle nach längerem Verreiben mit Essigester erhalten) das Hydrochlorid des *L*-Methionin-*d*-sulfoxyd-methylesters. Umkristallisiert aus Methanol/Essigester: 8,52 g (78%), Smp. 176–178°; $[\alpha]_D = +85,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Wasser); enthält ca. 5% *l*-Sulfoxyd-Derivat (siehe Tab. III); papierchromatographisch einheitlich: Rf-Werte in I 0,55, II 0,42, III 0,57, IV 0,57.

$C_8H_{14}O_3NCIS$ (215,7) Ber. C 33,41 H 6,54 S 14,87 Cl 16,44%
Gef. „ 33,65 „ 6,59 „ 14,86 „ 16,23%

Bei Verwendung einer konzentrierteren Lösung von HCl in Methanol lässt sich papierchromatographisch die Bildung von *L*-Methionin-methylester nachweisen (vgl. Reduktion von *L*-Methionin-sulfoxyd mit HBr in Eisessig/Aceton).

b) *Freier Ester*: Eine Suspension von 2,16 g (10 mMol) Ester-hydrochlorid in 10 ml Essigester wird mit 2,5 ml einer 5*N*-Lösung von NH_3 in Methanol versetzt, 10 Min. geschüttelt und nach Zugabe von weiteren 15 ml Essigester 10 Min. bei 0° stehengelassen. Das in quantitativer Menge abgeschiedene Ammoniumchlorid wird abfiltriert, das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur vorsichtig eingedampft und der als Öl erhaltene Ester mehrmals mit Petroläther gewaschen und bei 0,1 Torr getrocknet: 1,65 g (91%). Zur weiteren Reinigung wird der Ester in 30 ml eines Gemisches Essigester/Äther 4:1 aufgenommen, die Lösung von wenig ungelöstem Material abdekantiert, im Vakuum eingengt und der Rückstand nach Waschen mit wenig Äther bei 0,1 Torr getrocknet: 1,53 g (85%); farbloses leicht bewegliches Öl, das für weitere Umsetzungen genügend rein ist.

Der Ester lässt sich in kleinen Mengen destillieren: Sdp. 136–138°/0,05 Torr.

$C_8H_{13}O_3NS$ Ber. C 40,21 H 7,31 N 7,82% Gef. C 40,55 H 7,13 N 7,67%

Durch Behandlung des destillierten freien Esters mit einer Lösung von HCl in Essigester wird in praktischer quantitativer Ausbeute das optisch reine Ester-hydrochlorid zurückgewonnen: $[\alpha]_D^{27} = +84,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$ in Wasser).

c) Veresterung von L-Methionin-*d,l*-sulfoxyd unter den oben angegebenen Bedingungen resp. mittels Thionylchlorid in Methanol³²): siehe Tab. III; Smp. 170–174 resp. 168–171°, keine Depression mit nach Methode a) hergestelltem Hydrochlorid.

d) Oxydation von L-Methionin-methylester-hydrochlorid⁹): 1,0 g (5 mMol) Ester-hydrochlorid, $[\alpha]_D^{25} = +27,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in H₂O), wird in 10 ml 50-proz. Methanol gelöst und nach Zugabe von 0,7 ml (6 mMol) 30-proz. Hydrogenperoxyd bei 25° stehengelassen. Nach 5 Std. ist die Reaktion beendet (jodometrische Bestimmung von H₂O₂) und die Reaktionslösung wird im Vakuum bei max. 40° eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben und bei 0,1 Torr getrocknet; Kristallisation wie in a): 0,89 g (82%), Smp. 166–169°; nach Umkristallisieren aus Methanol/Essigester Smp. 170–172°; $[\alpha]_D$ siehe Tabelle III; papierchromatographisch einheitlich (Rf-Werte: siehe oben).

C₈H₁₄O₃NCIS (215,7) Ber. C 33,41 H 6,54 Cl 16,44% Gef. C 33,03 H 6,50 Cl 16,17%

e) Verseifung: Eine Lösung von 216 mg (1 mMol) L-Methionin-sulfoxyd-methylester-hydrochlorid in 0,5 ml Wasser wird mit 5,5 ml einer 0,4N Bariumhydroxydlösung versetzt und 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe der ber. Menge Schwefelsäure wird das Bariumsulfat abzentrifugiert, die klare Lösung im Vakuum auf ca. 1 ml eingengt, mit Amylamin neutralisiert und mit 10 ml Aceton versetzt. Das ausgeschiedene L-Methionin-sulfoxyd zeigt nach Waschen mit Methanol und Äther die in Tab. III angegebenen Drehwerte. Ausbeuten: 135–150 mg (82–91%).

C. Synthese von H · Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met · OH

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin-methylester. Eine Lösung von 100 g (0,4 Mol) Carbobenzoxy-L-prolin³³) und 78 g (0,4 Mol) Tyrosin-methylester³⁴) in 1000 ml Methylenchlorid wird bei 0° mit 86,5 g (0,42 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und über Nacht bei 0° stehengelassen. Der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wird nach Zugabe von 3 ml Eisessig abfiltriert und das Filtrat unter Kühlung mit 1N Salzsäure, 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand liefert beim Versetzen mit Essigester/Äther 160 g (91%) kristallines Material vom Smp. 72–74°; Smp. unverändert nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester; $[\alpha]_D^{27} = -24^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,1$ in Äthanol).

C₂₅H₂₆O₆N₂ (426,5) Ber. C 64,77 H 6,15 N 6,57% Gef. C 64,74 H 6,23 N 6,81%

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin. 149 g (0,35 Mol) Carbobenzoxy-L-propyl-L-tyrosin-methylester werden in 750 ml Methanol gelöst, auf 0° gekühlt und mit 900 ml vorkühlter 1N Natronlauge versetzt. Die Lösung wird 2 Std. bei 0° stehengelassen, mit 2N Salzsäure auf pH 7 gestellt, im Vakuum vom Methanol befreit und bei 0° mit 2N Salzsäure angesäuert. Das ausgeschiedene ölige Material wird in Essigester aufgenommen, mit 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, durch Zugabe von 2N Salzsäure bei 0° aus der alkalischen wässrigen Lösung als Öl ausgefällt und wiederum in Essigester aufgenommen. Die getrocknete Essigesterlösung ergibt nach Eindampfen im Vakuum 135 g (94%) Substanz als farblosen Schaum, der direkt für die weiteren Umsetzungen verwendet wird.

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester. Eine Lösung von 135 g (0,33 Mol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin und 109 g (0,35 Mol) N^ε-Tosyl-L-lysin-methylester (frisch hergestellt aus dem Hydrochlorid³⁵) in 1000 ml Acetonitril wird bei 0° mit 72 g (0,35 Mol) Dicyclo-

³²) M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1109 (1953).

³³) A. BERGER, J. KURTZ & E. KATCHALSKI, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5552 (1954); W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958); vgl. auch W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 614 (1957).

³⁴) E. FISCHER & W. SCHRAUTH, *Liebigs Ann. Chem.* **354**, 21 (1907); Ester-hydrochlorid nach R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955), hergestellt.

³⁵) Smp. 132–134° (aus Acetonitril); $[\alpha]_D^{28} = +13,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Wasser); C₁₄H₂₂O₄N₂S, HCl (350,9), Ber. C 47,92, H 6,61, N 7,98%; Gef. C 47,83; H 6,54, N 8,19%; vgl. Herstellung des entsprechenden Äthylester-hydrochlorids: R. ROESKE, F. H. C. STEWART, R. J. STEDMAN & V. DU VIGNEUAD, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5883 (1956).

hexyl-carbodiimid versetzt, über Nacht bei 0° stehengelassen und nach Zugabe von 2,5 ml Eisessig vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 1000 ml Essigester aufgenommen, die Lösung unter Kühlung neutral gewaschen und im Vakuum auf ca. 500 ml eingengt. Beim Stehen bei 0° scheidet sich das Reaktionsprodukt langsam in amorpher Form ab (163 g, Smp. 131–133°); nach Umkristallisieren aus Methanol: 139,5 g (60%) feinkristallines Material vom Smp. 134–136°, $[\alpha]_D^{25} = -47^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Äthanol).

$C_{36}H_{44}O_9N_4S$ (708,9)	Ber. C 60,99	H 6,26	N 7,91	S 4,53%
	Gef. „ 60,77	„ 6,56	„ 7,98	„ 4,43%

Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (3 Std. bei 25°) liefert den Carbobenzoxy-L-prolyl-O-acetyl-L-tyrosin-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester vom Smp. 109–111° (aus Essigester); $[\alpha]_D^{25} = -42,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$ in Äthanol).

$C_{38}H_{46}O_{10}N_4S$ (750,9)	Ber. C 60,78	H 6,18	N 7,46%	Gef. C 60,66	H 6,37	N 7,44%
----------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (III). 7,1 g (10 mMol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester werden in 30 ml Methanol gelöst, mit 30 ml 1N Natronlauge versetzt und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung geschieht in der für Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin angegebenen Weise und ergibt nach Verreiben des Rohproduktes mit Äther 6,9 g (98%) Substanz als farbloses, amorphes Pulver, $[\alpha]_D^{25} = -33,2^\circ$ ($c = 4,8$ in Äthanol); papierchromatographisch einheitlich (Rf-Werte in I 0,83, in III 0,84).

$C_{35}H_{42}O_9N_4S$ (694,9)	Ber. C 60,50	H 6,09	N 8,06%	Gef. C 60,39	H 6,62	N 7,95%
-------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-L-methionin-methylester (IV). 5,20 g (7,5 mMol) III und 1,30 g (8 mMol) L-Methionin-methylester (frisch aus dem Hydrochlorid³⁶) hergestellt und destilliert^{32,38}), Sdp. 58–60°/0,02 Torr werden in 40 ml Acetonitril gelöst, bei -5° mit 1,65 g (8 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und über Nacht bei 0° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung (vgl. Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin-methylester) scheidet sich das Reaktionsprodukt aus Essigester/Äther bei 0° langsam in amorpher Form aus: 5,47 g, Smp. 77–80°; nach zweimaligem Umfällen aus Aceton/Äther 4,16 g (66%), Smp. ca. 83–86° (unscharf); $[\alpha]_D^{25} = -31,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Eisessig), $-45,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Äthanol), $-37,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid).

$C_{41}H_{53}O_{10}N_5S_2$ (840,1)	Ber. C 58,62	H 6,36	N 8,34	S 7,63%
	Gef. „ 58,31	„ 6,20	„ 8,16	„ 7,89%

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-L-methionin-sulfoxyd-methylester (V). – Va) durch Oxydation: Eine Lösung von 1,68 g (2 mMol) des Esters IV in 5 ml Äthanol wird mit 0,28 ml (2,5 mMol) 30-proz. Hydrogenperoxyd versetzt und bei 25° stehengelassen. Die Oxydation verläuft anfänglich sehr rasch (jodometrische Bestimmung des überschüssigen H₂O₂) und ist nach 4 Std. beendet. Das Reaktionsprodukt scheidet sich während dieser Zeit langsam in kristalliner Form aus und wird nach 8 Std. abfiltriert: 1,21 g (71%), Smp. 179–181°; aus der Mutterlauge lassen sich weitere 0,10 g (6%) reines Material isolieren. Zur Analyse umkristallisiert aus wenig Methanol: Smp. 181–183° (scharf); $[\alpha]_D^{25} = -18,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-28,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$ in Dimethylformamid); *d*-Sulfoxyd-Derivat angereichert (siehe Tab. II); Rf-Werte > 0,9 in den Systemen I–IV.

$C_{41}H_{53}O_{11}N_5S_2$ (856,1)	Ber. C 57,53	H 6,24	O 20,56	N 8,18	S 7,49%
	Gef. „ 57,27	„ 6,21	„ 20,61	„ 8,25	„ 7,44%

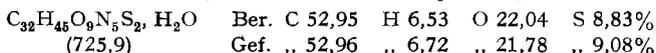
Durch Oxydation mit H₂O₂ in Eisessig (30 Min. bei 25°) entsteht das identische Produkt; Ausbeute 62%; $[\alpha]_D^{25} = -28,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$ in Dimethylformamid).

Vb) durch Kondensation: 3,50 g (5 mMol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (III) und 1,07 g (6 mMol) L-Methionin-*d*-sulfoxyd-methylester (frisch aus dem oben beschriebenen, ca. 5% *l*-Sulfoxyd-Derivat enthaltenden Hydrochlorid hergestellt) werden in einem Gemisch von 5 ml Dimethylformamid und 5 ml Acetonitril gelöst und bei -10° mit einer Lösung von 1,15 g

³⁶) Eine Probe des Destillats wurde in das Hydrochlorid zurückgeführt: $[\alpha]_D^{25} = +26,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Wasser); Literaturwert = $+26,8^\circ$ ⁹⁾; keine Racemisierung bei der Destillation.

(5,5 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml Acetonitril versetzt. Nach 18 Std. bei 0° wird das ausgeschiedene Gemisch von Reaktionsprodukt und Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit 10 ml Dimethylformamid verrührt, vom unlöslichen Harnstoffderivat abfiltriert und das Filtrat bei 0,1 Torr und max. 35° eingedampft. Der feste Rückstand liefert nach Verreiben mit Wasser und Alkohol 3,06 g (71%) kristallines Material vom Smp. 183–185°; umkristallisiert aus Methanol: 2,80 g (65%), Smp. 187–189°; $[\alpha]_D^{25} = -12,4 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-21,6 \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid); hauptsächlich *d*-Sulfoxyd-Derivat (siehe Tab. II); Gef. C 57,18, H 6,30, O 20,84%.

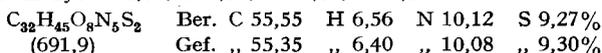
L-Prolyl-L-tyrosyl-N^e-tosyl-L-lysyl-L-methionin-sulfoxyd (VI). — VIa) *d,l*-Sulfoxyd durch Hydrolyse: 1,03 g (1,2 mMol) des Esters Va ($[\alpha]_D^{25} = -18,4^\circ$ in Eisessig) werden in 10 ml konz. Salzsäure suspendiert und 1 Std. auf 40° erwärmt. Das Ausgangsmaterial geht innert ca. 15 Min. in Lösung und gleichzeitig scheidet sich Benzylchlorid als Öl aus. Nach Eindampfen bei 0,1 Torr und max. 30° wird das als ölig Rückstand erhaltene Tetrapeptid-hydrochlorid über KOH getrocknet (1 Std. bei 0,1 Torr) und mehrmals mit Äther verrieben. Zur Überführung in das freie Peptidderivat wird das Hydrochlorid in 3 ml Methanol gelöst, die Lösung durch Zugabe von NH₃ in Methanol (2,5*N*-Lösung) schwach basisch gestellt, das ausgeschiedene kristalline Material nach 1 Std. abfiltriert und mit Methanol und Äther gewaschen: 0,60 g (70%), Smp. 232–234°; papierchromatographisch einheitlich: Rf-Werte in Syst. I 0,64, II 0,73, III 0,77, IV 0,75. Die zur Analyse aus 80-proz. Äthanol umkristallisierte Substanz vom Smp. 236–238° enthält 1 Mol Wasser, das sich durch Trocknung bei 100° nicht entfernen lässt; $[\alpha]_D^{25} = -5,5 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $-35,9 \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in 0,5*N* KHCO₃-Lösung).



Auch die Behandlung des durch Kondensation erhaltenen Carbenbenzoxy-tetrapeptid-methylesters Vb ($[\alpha]_D^{25} = -12,4^\circ$ in Eisessig) mit konz. HCl ergibt unter den obigen Bedingungen das *d,l*-Sulfoxyd-Derivat VIa (vgl. Verhalten von *L*-Methionin-*d*-sulfoxyd); $[\alpha]_D^{27} = -35,5 \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in 0,5*N*-KHCO₃-Lösung).

VIb) durch Oxydation: 346 mg (0,5 mMol) *L*-Prolyl-*L*-tyrosyl-*N^e*-tosyl-*L*-lysyl-*L*-methionin (VII)¹¹ werden in 2,5 ml Eisessig gelöst und bei ca. 10° mit 0,6 ml einer 1*N*-Lösung von Hydrogenperoxyd in Eisessig versetzt. Nach 15 Min. bei 10–15° ist die Oxydation beendet (jodometrische Bestimmung von überschüssigem H₂O₂) und nach 30 Min. wird die Lösung bei 0,1 Torr und max. 25° rasch eingengt und der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben. Das kristalline Material wird nach 1 Std. abfiltriert und mit Methanol gewaschen: 305 mg (86%), Smp. 233–235°; papierchromatographisch einheitlich (kein Ausgangsmaterial nachweisbar). Nach Umkristallisieren aus 80-proz. Äthanol, Smp. 237–239; keine Depression mit Va; $[\alpha]_D^{25} = -2,4 \pm 1^\circ$ ($c = 4,2$ in Eisessig), $-31,7 \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$ in 0,5*N* KHCO₃-Lösung); *d*-Sulfoxyd-Derivat schwach angereichert (siehe Tab. II).

L-Prolyl-L-tyrosyl-N^e-tosyl-L-lysyl-L-methionin (VII). Eine Suspension von 354 mg (0,5 mMol) *L*-Prolyl-*L*-tyrosyl-*N^e*-tosyl-*L*-lysyl-*L*-methionin-*d,l*-sulfoxyd (VIa oder VIb) in 2,5 ml H₂O wird mit 0,35 ml (5 mMol) frisch destillierter Thioglykolsäure versetzt und in N₂-Atmosphäre unter öfterem Umschütteln 20 Std. bei 50° stehengelassen (anfänglich klare Lösung, dann allmählicher Austritt des Reaktionsprodukts als Öl). Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der ölige Rückstand mehrmals mit Äther verrieben, das pulverige Material in wenig Methanol aufgenommen und die Lösung durch Zugabe von NH₃ in Methanol (2,5*N*-Lösung) schwach basisch gestellt. Die kristalline Substanz wird nach 30 Min. (bei 0°) abfiltriert, mit heissem Methanol verrieben und isoliert: 299 mg (86%), Smp. 223–226°; keine Depression mit authentischem Material¹¹⁾); $[\alpha]_D^{26} = -14,0 \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Eisessig), $-42,8 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in 0,5*N* KHCO₃-Lösung); Rf-Werte in Syst. I 0,78, II 0,87, III 0,81, IV 0,83.



Herrn Prof. R. SCHWYZER möchte ich für seine Anregung zu dieser Arbeit herzlich danken. Herrn R. SCHAUB danke ich für seine wertvolle technische Mitarbeit, Herrn Dr. W. PADOWETZ für die analytischen Daten und Herrn E. von ARX für die Ausführung der Papierchromatogramme.

¹¹⁾ Die in Ref. ¹¹⁾ angeführte Substanz zeigte nach Verreiben mit heissem Methanol ebenfalls den Smp. 223–226°; $[\alpha]_D^{26} = -42,0 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in 0,5*N* KHCO₃-Lösung).

SUMMARY

The unwanted side reactions often encountered in the synthesis of methionine containing peptides can be eliminated by a temporary conversion of the thioether function of methionine into the sulfoxide at any stage of a peptide synthesis. The sulfoxide oxygen is introduced without the formation of a sulfone when a small excess of hydrogen peroxide is used, and its elimination is easily achieved by reduction with thioglycolic acid. In contrast to the carbobenzoxy derivatives of methionine the removal of the carbobenzoxy group from the corresponding sulfoxides proceeds smoothly by mild treatment with concentrated hydrochloric acid. The synthesis of the peptide derivative H-Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met-OH, using this method, is described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

9. Über den Abbau von Glykokoll-[2¹⁴-C] durch Meerschweinchenleberschnitte

von E. Jenny und F. Leuthardt

(15. XI. 60)

Trotzdem Glykokoll zu den am längsten bekannten Aminosäuren gehört, gelang es doch erst in neuerer Zeit, bessere Einsicht in seine Umwandlungen zu gewinnen. Wichtig war dabei die Erkenntnis, dass der Glykokollstoffwechsel mit dem des Serins eng verbunden ist. Der reversible Übergang von Glykokoll in Serin^{1) 2)} hat also eine grosse biochemische Bedeutung. Während der Abbau beider Aminosäuren je nach der Stoffwechsellage verschiedene Wege einschlagen kann³⁾, dürfte die Neusynthese von Glykokoll fast ausschliesslich über Serin erfolgen⁴⁾. Das Kohlenstoffgerüst wird dabei von einer Verbindung geliefert, die leicht aus den Triosen der Glykolyse entstehen kann⁵⁾. Wahrscheinlich ist Hydroxypyruvat oder 3-Phosphohydroxypyruvat direkte Vorstufe^{6) 7)}, während Pyruvat ausgeschlossen werden konnte. Der Abbau von L-Serin scheint hingegen nicht wesentlich über Hydroxypyruvat zu führen. Injiziert man nämlich Ratten L-Serin-[3-¹⁴C] und isoliert darauf die gebildete Leberglucose, so findet man eine starke Randomisierung zwischen C1

1) W. SAKAMI, in A Symposium on Amino Acid Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, Seite 658–683; F. LEUTHARDT & B. GLASSON, *Helv.* 25, 445 (1942).

2) D. SHEMIN, in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XIV, Seite 161–167 (1950).

3) D. ELWYN, J. ASMORE, G. F. CAHILL, JR., S. ZOTTU, W. WELCH & B. HAISTINGS, *J. biol. Chemistry* 226, 735 (1957).

4) H. R. V. ARNSTEIN, in *Advances in Protein Chemistry IX*, Seite 1–91, Academic Press Inc. Publishers, New York (N. Y.) (1954).

5) H. R. V. ARNSTEIN & D. KEGELEVIĆ, *Biochem. J.* 62, 199 (1956).

6) R. E. KOEPPE, M. L. MINTHORN & R. J. HILL, *Federation Proc.* 15, 290 (1956); *Arch. Biochemistry & Biophys.* 68, 355 (1957).

7) A. ICHIHARA & D. M. GREENBERG, *J. biol. Chemistry* 224, 331 (1957).