

Darstellungsversuche von Peptiden mit funktionellen endständigen Gruppen und Bestimmung der Katalaseaktivität von Peptid-Metall-Chelaten

Von G. FAUST und M. KLEFEL

Mit 5 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Es wird die Darstellung von N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminosäuren) angegeben. α -Aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäurederivate können durch Umsetzung von Oxazolonen synthetisiert werden. Das Cu²⁺-Bindungsvermögen von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) wurde bestimmt und mit dem von Histidin verglichen. N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) aktiviert die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung durch Cu²⁺-Ionen stärker, N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) weniger als L-Histidin.

Seitdem man weiß, daß die Apofermente häufig Schwermetallionen enthalten, die für die Enzymwirkung erforderlich sind, werden Untersuchungen über Veränderungen der katalytischen Eigenschaften von Schwermetallionen durch Chelatbildner durchgeführt. Als Modellreaktion für Versuche über den Einfluß von Aminosäuren und Peptiden auf die katalytischen Eigenschaften von Cu²⁺-Ionen ist die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung geeignet. So hat L. A. NIKOLAJEW¹⁾ gefunden, daß α -Aminosäuren die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung durch Kupferionen weniger aktivieren als β -Aminosäuren. W. LANGENBECK und Mitarbeiter²⁾ konnten zeigen, daß Histidin, Histidinanhydrid und Arginin die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung durch Cu²⁺-Ionen aktivieren. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde versucht, Verbindungen mit zwei endständigen, peptidartig gebundenen α -Aminosäuren zu synthetisieren, die charakteristische komplexbildende Gruppen enthalten.

1) L. A. NIKOLAJEW, Chem. Abstr. **42**, 3653b, 1617c (1948); **44**, 5689g (1950); **49**, 1416a, 7350b (1955).

2) W. LANGENBECK, H. MIX u. TITTELBACH-HELMRICH, W., Chem. Ber. **90**, 2699 (1957); **89**, 69 (1956).

Für die gleichzeitige Einführung von zwei endständigen α -Aminosäuren wurde die Umsetzung von ω, ω' -Di-[oxazol-(5)-yl-(2)]-Derivaten mit α -Aminosäuren bzw. deren Derivaten gewählt. E. MOHR und Mitarbeiter³⁾ benutzten bereits Oxazolone zur Darstellung von Benzoylpeptiden. Später haben M. BERGMANN und Mitarbeiter⁴⁾ über Peptidsynthesen aus Azlactonon, Aminosäuren oder deren Derivaten berichtet. Umsetzungen von ω, ω' -Di-[oxazol-(5)-yl-(2)]-Derivaten mit α -Aminosäuren sind unseres Wissens bisher in der Literatur nicht erwähnt.

Oxazolone reagieren sowohl mit α -Aminosäureanionen in wäßrigem Aceton als auch mit α -Aminosäureestern in organischen Lösungsmitteln. Um eine Hydrolyse der Dioxazol-Derivate zu vermeiden, wurden wasserfreie Lösungsmittel für die Umsetzung der Dioxazol-Derivate angewandt.

Als Ausgangsprodukt wurde 1,4-Di-[4,4-dimethyloxazol-(5)-yl-(2)]-butan gewählt, das aus N.N'-Adipoyl-bis-(α -amino-isobuttersäure) durch Wasserabspaltung mit Acetanhydrid erhalten wird, weil bei diesen Versuchen gleichzeitig geprüft werden sollte, ob sich durch Umsetzung mit α -Amino-isobuttersäureestern N.N'-Adipoly-bis-(α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure) darstellen läßt.

Bei Peptidsynthesen ist die Anwendung von α -Aminosäurebenzylestern vorteilhaft, weil die Peptidbenzylester oder die Carbonbenzoylpeptidbenzylester durch katalytische Hydrierung leicht in die freien Peptide überführt werden können. Der benötigte α -Aminoisobuttersäurebenzylester wurde nach zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Methoden dargestellt. Analog der von B. F. ERLANGER und R. M. HALL⁵⁾ für die Darstellung von Phenylalaninbenzylesterhydrochlorid angegebenen Vorschrift wurde aus α -Aminoisobuttersäure und Benzylalkohol in Gegenwart von Polyphosphorsäure α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid in 63–72proz. Ausbeute erhalten. Der freie α -Aminoisobuttersäurebenzylester ist durch Umsetzung des Esterhydrochlorids mit Triäthylamin zugänglich. α -Aminoisobuttersäurebenzylester erhält man auch, wenn man N-Carbobenzyloxy- α -aminoisobuttersäure mit Benzylalkohol in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure verestert und den Carbobenzyloxyrest mit Bromwasserstoff abspaltet. Aus dem so gewonnenen Esterhydrobromid läßt sich der freie

³⁾ E. MOHR u. Mitarb., Ber. dtsch. chem. Ges. **41**, 798 (1908); **42**, 2521 (1909); J. prakt. Chem. **81**, 49, 473 (1910).

⁴⁾ M. BERGMANN u. Mitarb., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **167**, 91 (1927); **175**, 154 (1928); **187**, 196 (1930); Liebigs Ann. Chem. **449**, 277 (1926).

⁵⁾ B. F. ERLANGER u. R. M. HALL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5781 (1954).

α -Aminosobuttersäurebenzylester wie aus dem Hydrochlorid mit Triäthylamin darstellen.

Während Oxazolone mit α -Aminosäureestern in Essigester bereits bei Zimmertemperatur reagieren, findet zwischen 1.4-Di-[4.4-dimethyloxazol-(5)-yl-(2)]-butan und α -Aminoisobuttersäurebenzylester unter gleichen Bedingungen auch nach längerem Stehen keine Umsetzung statt. Wird jedoch 1.4-Di-[4.4-dimethyloxazol-(5)-yl-(2)]-butan mit α -Aminoisobuttersäurebenzylester in absolutem Pyridin 5 Stunden unter Rückfluß gekocht, so erhält man N.N'-Adipoyl-bis- $[\alpha$ -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäurebenzylester) in 26proz. Ausbeute.

Die für eine Umsetzung erforderlichen verschärften Reaktionsbedingungen und die relativ schlechten Ausbeuten sind wahrscheinlich auf die beiden am α -Kohlenstoffatom der α -Aminoisobuttersäure befindlichen Methylgruppen zurückzuführen, die auch die Synthese von Peptiden wie N-Carbobenzoxy- α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure⁶⁾ erschweren.

N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäurebenzylester) erhält man auch, wenn man aus N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobuttersäure) und Dicyclohexylcarbodiimid 1.4-Di-[4.4-dimethyloxazol-(5)-yl-(2)]butan darstellt und dieses ohne Isolierung mit α -Aminoisobuttersäurebenzylester umsetzt. Auf diese Weise gewonnener N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäurebenzylester) enthält jedoch geringe Mengen Dicyclohexylharnstoff, deren Abtrennung mühsam ist.

Durch katalytische Hydrierung des Bisesters wurde N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure) erhalten. Diese Verbindung bindet pro Mol ein halbes Mol Wasser so fest, daß es durch mehrstündiges Trocknen bei 150 °C und 14 Torr nicht entfernt werden kann. Die Erscheinung, daß Verbindungen mit C-terminaler α -Aminoisobuttersäure Wasser addieren, wurde auch bei Peptiden wie α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure und α -Aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobutyryl-glycyl- α -aminoisobuttersäure⁶⁾ beobachtet.

Analog der Darstellung von N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure) wurde versucht, aus 1.4-Di-[4.4-dimethyloxazol-(5)-yl-(2)]-butan und L-Histidinmethylester N.N'-Adipoyl-bis- $(\alpha$ -aminoisobutyryl-L-histidinmethylester) darzustellen. Da L-Histidinmethylester bei erhöhten Temperaturen sich rasch in 3.6-Dioxo-2.5-bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-piperazin umwandelt, mußte bei Zimmertemperatur gearbeitet werden. Unter diesen Bedingungen erfolgt auch

⁶⁾ G. FAUST u. H. LANGE, J. prakt. Chem., im Druck.

bei einem Überschuß an L-Histidinmethylester nur teilweise Umsetzung. Das Reaktionsprodukt konnte nicht analysenrein erhalten werden und enthielt eine stickstoffärmere Verbindung, wahrscheinlich bei der Aufarbeitung gebildeten N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäuremethylester).

Andere Versuche zur Darstellung von N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobutyryl-L-histidinmethylester) nach der Azid-Methode waren ebenfalls erfolglos, da es uns nicht gelang, N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäurehydrazid) aus dem entsprechenden Methylester herzustellen. Bei weiteren Versuchen wurde deshalb α -Aminoisobuttersäure durch das eine CH₃-Gruppe weniger enthaltende Alanin ersetzt.

Zur Darstellung von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinmethylester) wurde zunächst Adipinsäurediazid mit Alaninäthylester umgesetzt. Durch Aminolyse mit Hydrazin erhält man aus N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninäthylester) das entsprechende Hydrazid und durch Einwirkung von salpetriger Säure N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninazid). Bei der Reaktion mit L-Histidinmethylester konnte N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinmethylester) nicht zur Kristallisation gebracht werden. Aus diesem Grunde wurde durch Einwirkung von ammoniakalischem Methanol auf den Ester N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) dargestellt. Wie andere Histidinpeptidderivate⁷⁾ bindet N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) Wasser, das durch Trocknen bei 100 °C und 2 Torr nicht entfernt werden kann.

Zum Vergleich wurde ferner N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) aus Adipinsäureazid und Histidinmethylester und anschließende Aminolyse dargestellt. N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) bindet pro Mol ebenfalls $\frac{1}{2}$ Mol Wasser fest.

Aus N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinmethylester) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinmethylester) erhält man durch Umsetzung mit Hydrazinhydrat N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinhydrazid) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinhydrazid), die als Ausgangsprodukte für die Anknüpfung weiterer Aminosäuren verwendet werden können.

Die dargestellten Histidinderivate, N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) und N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid), bilden erwartungsgemäß Kupferchelatverbindungen. Werden wäßrige Lösungen der Histidinderivate mit wenigen Tropfen einer verdünnten Kupferacetatlösung versetzt, so färbt sich die Lösung tief blau.

Um das Komplexbildungsvermögen von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) mit Kup-

⁷⁾ A. PATCHORNIK, A. BERGER u. E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5227 (1957).

ferionen mit dem von Histidin vergleichen zu können, wurde das Cu^{2+} -Bindungsvermögen der beiden Histidinamidderivate nach der von G. WOLFF, S. FALLAB und H. ERLLENMEYER angegebenen Methode⁸⁾ bestimmt. Nach diesem Verfahren wird das Cu^{2+} -Bindungsvermögen in der Weise ermittelt, daß man einer gepufferten $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ -Lösung den zu bestimmenden Chelatbildner und Cu^{2+} -Ionen zusetzt und die Zunahme an $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ gegenüber einem Vergleichsversuch ohne Chelatbildner ermittelt. Die Methode liefert jedoch nur vergleichbare Werte für das Cu^{2+} -Bindungsvermögen, wenn man die Messungen bei gleichen pH -Werten durchführt.

Das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Histidin wurde bereits von G. WOLFF, S. FALLAB und H. ERLLENMEYER⁸⁾ bestimmt. Unsere Werte stimmen mit diesen gut überein. In Abb. 1 wurde das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) (I), N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) (II) und L-Histidin (III) graphisch dargestellt. Als Abszisse ist die Konzentration des im System vorhandenen Chelatbildners aufgetragen, als Ordinate die kolorimetrisch ermittelte verbleibende $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ -Konzentration. Das größte Cu^{2+} -Bindungsvermögen besitzt N.N'-Adipoyl-bis-

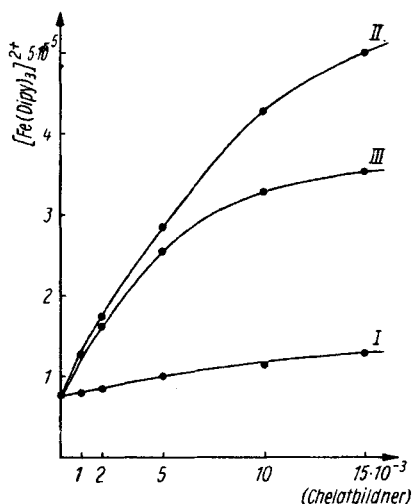


Abb. 1. Cu^{2+} -Bindungsvermögen von N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) (I), N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) (II) und L-Histidin (III)

(D.L-alanyl-L-histidinamid), während das von N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) wesentlich geringer als das von Histidin ist. Daß durch Acylierung von Histidin das Cu^{2+} -Bindungsvermögen erniedrigt wird, konnte z. B. am Acetylhistidin gezeigt werden⁹⁾. Das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Acetylhistidin ist nur wenig kleiner als das von N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid). Die Tatsache, daß die Histidinpeptidderivate Cu^{2+} -Ionen so fest zu binden vermögen, daß sie der Austauschreaktion zwischen $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ und Cu^{2+} entzogen werden, kann als Beweis für die Chelatstruktur der Verbindungen zwischen Cu^{2+} -Ionen und

⁸⁾ G. WOLFF, S. FALLAB u. H. ERLLENMEYER, *Experientia* (Basel) **11**, 440 (1955); *Helv. chim. Acta* **37**, 1050 (1954); **38**, 92 (1955); **40**, 187 (1957).

⁹⁾ J. PHOTAKI, D. SCHÄUFLE, S. FALLAB u. H. ERLLENMEYER, *Helv. chim. Acta* **40**, 187 (1957).

N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) bzw. N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) angesehen werden.

Von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) sollte man erwarten, daß sie mit Hämin zur Bildung von Parahämatischen fähig sind. Setzt man einer verdünnten wäßrigen Lösung von Hämin in Ammoniak N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) bzw. N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) zu, so erfolgt ein deutlicher Farbumschlag der Lösung von braun nach rotbraun. Dieser Farbumschlag könnte als ein Zeichen der Parahämatinbildung gedeutet werden. Durch Synthese von Peptiden, die zwei Histidinbausteine in genügend großer Entfernung besitzen, sollte es möglich sein, solche Parahämatine zu erhalten, bei denen die beiden für die Parahämatinbildung benötigten Imidazolyl- bzw. Histidylreste über eine Peptidbrücke um das eine flache Scheibe bildende Hämin miteinander verknüpft sind. Allerdings würde eine Entscheidung zwischen dieser Möglichkeit und der, daß das zwei Histidylreste besitzende Peptid an zwei Hämin-, „Scheiben“ jeweils nur eine Koordinationsstelle besetzt, schwierig sein.

Der Einfluß auf die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung der Cu-Chelate von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) und N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) wurde nach der von W. LANGEN-

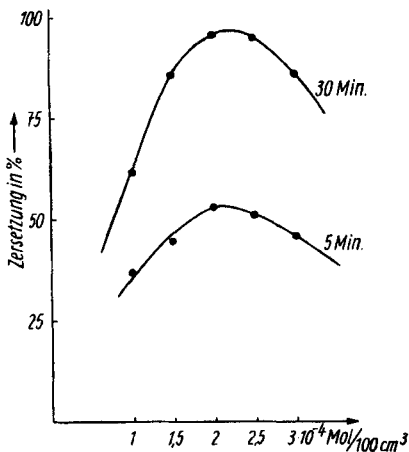


Abb. 2. Katalaseaktivitäten von Kupferchelaten des N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) bei verschiedenen Molverhältnissen und konstantem $p_H = 8$

BECK, H. MIX und W. TITTELBACH-HELMRICH angegebenen Methode²⁾ bestimmt. Bekanntlich ist die Katalasewirkung von Metallchelaten von der Konzentration der Chelatbildner abhängig. Für die Kupferchelate von Histidin und Histidinanhydrid wurde eine optimale Wirkung bei einem Molverhältnis von Kupfersulfat zum Chelatbildner von 1:2 gefunden²⁾. Deshalb haben wir zunächst die Katalaseaktivitäten des N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid)-Kupferchelats bei verschiedenen Molverhältnissen und konstantem $p_H = 8$ gemessen. Die Lösungen enthielten immer $1 \cdot 10^{-4}$ Mol CuSO_4 pro

100 cm^3 , während die Konzentration des Chelatbildners von $1 \cdot 10^{-4}$ bis $3 \cdot 10^{-4}$ Mol pro 100 cm^3 variiert wurde. In Abb. 2 wurde als

Abszisse die Konzentration des Chelatbildners und als Ordinate die ermittelte Wasserstoffperoxydzerersetzung (Mittelwerte von je 4 Messungen) nach 5 bzw. 30 Minuten aufgetragen. Das Optimum der Katalasewirkung liegt ebenfalls bei einem Molverhältnis von 1:2 (Cu^{2+} -Ionen: Chelatbildner).

Die Messungen der Katalaseaktivitäten der Kupfer-Chelat-Verbindungen in Abhängigkeit vom pH -Wert wurden deshalb bei einem Molverhältnis von 1:2 durchgeführt. Bei der Bestimmung der Katalase-

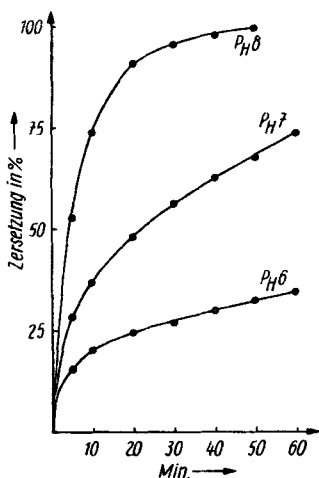


Abb. 3. Katalaseaktivitäten des $\text{N.N}'$ -Adipoyl-bis-(L-histidinamid)-Kupfer-Chelats bei verschiedenen pH -Werten und dem Molverhältnis 1:2

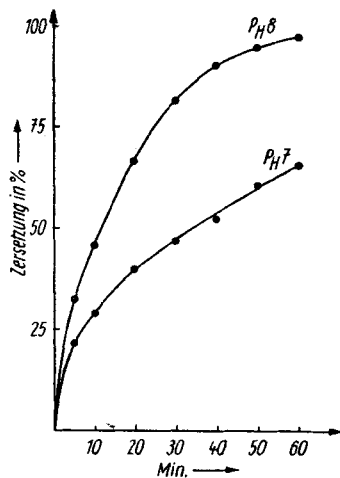


Abb. 4. Katalaseaktivitäten des $\text{N.N}'$ -Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid)-Kupfer-Chelats bei verschiedenen pH -Werten und dem Molverhältnis 1:2

aktivität der Kupferchelate von Histidin und Histidinanhydrid wurde ein Wirkungsoptimum bei $\text{pH} = 8$ gefunden²⁾. Die Katalaseaktivität des $\text{N.N}'$ -Adipoyl-bis-(L-histidinamid)-Kupfer-Chelats und des $\text{N.N}'$ -Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid)-Kupfer-Chelats ist ebenfalls bei $\text{pH} = 8$ am größten. In Abb. 3 und 4 wurde als Abszisse die Zeit in Minuten und als Ordinate die gemessene Wasserstoffperoxydzerersetzung in % aufgetragen. Die katalatische Wasserstoffperoxydzerersetzung verläuft zur Reaktionszeit nicht direkt proportional, sondern klingt nach einer raschen Zersetzung zu Beginn der Reaktion langsam ab.

Zum Vergleich und zur Kontrolle des Meßverfahrens wurde noch die bereits bekannte Katalaseaktivität des Histidin-Kupfer-Chelats gemessen. Die gefundenen Werte stimmen mit den Literaturangaben²⁾

gut überein. In Abb. 5 wurden die Katalaseaktivitäten der Kupferchelate von *N,N'*-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) (I), *N,N'*-Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid) (II) und L-Histidin (III) bei $p_H = 8$ und einem Molverhältnis von 1:2 gegenübergestellt. Das Kupferchelate von *N,N'*-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) aktiviert die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung stärker als das Histidin-Kupfer-Chelat.

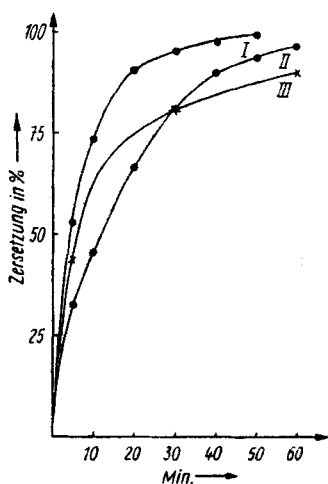


Abb. 5. Katalaseaktivitäten der Kupferchelate von *N,N'*-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) (I), *N,N'*-Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid) (II) und L-Histidin (III) bei $p_H = 8$ und dem Molverhältnis 1:2

Die Katalasewirkung des *N,N'*-Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid)-Kupfer-Chelats ist zunächst geringer als die des Histidin-Kupfer-Chelats, klingt aber weniger rasch ab und wird deshalb nach etwa 30 Minuten größer.

Vergleicht man die Katalaseaktivitäten der Kupfer-Chelate von *N,N'*-Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid), *N,N'*-Adipoyl-bis-(L-histidinamid) und Histidin mit dem Cu^{2+} -Bindungsvermögen der Histinderivate, so ergibt sich, daß mit steigendem Cu^{2+} -Bindungsvermögen die Katalaseaktivität der Kupferchelate abnimmt. Das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von *N,N'*-Adipoyl-bis-(D,L-alanyl-L-histidinamid) ist am größten, die Katalaseaktivität des Kupfer-Chelats am kleinsten. Dagegen aktiviert das Kupfer-Chelat von *N,N'*-Adipoyl-bis-(L-histidinamid), dessen Cu^{2+} -Bindungsvermögen am kleinsten ist, die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung stärker als die beiden anderen Kupfer-Chelate.

Untersuchungen, die von W. LANGENBECK und Mitarbeiter in letzter Zeit durchgeführt wurden, führten zu der Hypothese, daß nur solche Chelate, die eine Koordinationslücke besitzen, katalytisch stark wirksam sind¹⁰). An der Koordinationslücke lagert sich im allgemeinen das Lösungsmittel (oder auch eine andere Verbindung) locker an, das aber leicht durch das Substrat verdrängt werden kann.

Unsere Versuchsergebnisse können im Sinne dieser Hypothese gedeutet werden. Mit zunehmendem Cu^{2+} -Bindungsvermögen der Chelat-

¹⁰) W. LANGENBECK, Ber. Verh. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-naturwiss. Kl. 103, Heft 5, S. 11 (1959).

bildner — oder anders ausgedrückt — mit steigender Stabilität der Kupfer-Komplexe nimmt die katalatische Aktivität der Kupfer-Chelate ab (vgl. Abb. 1 und 5).

Experimenteller Teil

α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid: 20 g Polyphosphorsäure¹¹⁾ und 100 cm³ Benzylalkohol wurden bei einer Badtemperatur von 95–100 °C gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Nach anteilweiser Zugabe von 5 g α -Aminoisobuttersäure wurde 4 Stunden bei einer Badtemperatur von 95 bis 100 °C weitergerührt. Die Lösung wurde in 800 cm³ Wasser gegossen, das vorher mit 40 cm³ konz. HCl angesäuert wurde. Nach Zugabe von Äther wurde die wäßrige Schicht abgetrennt und die ätherische Schicht zweimal mit 2proz. Salzsäure gewaschen. Die wäßrige Schicht wurde mit dem Waschwasser vereinigt, alkalisch gemacht und dreimal mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden getrocknet und mit trockenem HCl fast gesättigt. α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid schied sich in Form farbloser Plättchen vom F. 168 °C ab. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Äther wurden farblose Nadeln oder Plättchen vom F. 170–171 °C¹²⁾ erhalten.

Ausbeute: 7–8 g (63–72% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 57,51%; gef.: C = 57,88%;
 $C_{11}H_{16}O_2HCl$ H = 7,02%; H = 7,18%;
 N = 6,10%; N = 6,35%.

α -Aminoisobuttersäurebenzylester: Zu einer Suspension von 5 g α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrochlorid in 32 cm³ Chloroform wurden 3,0 cm³ Triäthylamin unter Eiskühlung zugegeben. Nach Zugabe von 110 cm³ Äther blieb die Mischung 10 Minuten stehen. Dann wurde vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der zurückbleibende α -Aminoisobuttersäurebenzylester kann im Vakuum unzersetzt destilliert werden. $Kp_{18} = 131–131,5$ °C.

Ausbeute: 74% d. Th.

Elementaranalyse: ber.: C = 68,36%; gef.: C = 67,67%;
 $C_{11}H_{15}O_2N$ H = 7,82%; H = 7,74%;
 N = 7,25%; N = 7,41%.

N-Carbobenzyoxy- α -aminoisobuttersäurebenzylester: Eine Lösung von 6 g N-Carbobenzyoxy- α -aminoisobuttersäure¹³⁾ (F. 78 °C) in 40 cm³ Benzol wurde mit 4 g Benzylalkohol und 0,4 g p-Toluolsulfonsäure unter Rückfluß gekocht. Das bei der Veresterung gebildete Wasser wurde unter Verwendung eines Wasserabscheiders azeotrop abdestilliert. Nach 2–3 Stunden war die theoretisch zu erwartende Menge Wasser abdestilliert. Die benzolische Lösung wurde zweimal mit 15 cm³ einer 5proz. Kaliumbicarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Carbobenzyoxy- α -aminoisobuttersäurebenzylester kristallisiert in derben farblosen Kristallen vom F. 66,5–67 °C.

Ausbeute: 35–40% d. Th.

¹¹⁾ F. UHLIG, Angew. Chem. **66**, 435 (1954).

¹²⁾ Sämtliche Schmelzpunkte wurden mit KOFLER-Mikroschmelzpunkt-Bestimmungsapparat ermittelt.

¹³⁾ M. BERGMANN u. Mitarb., Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1194 (1932); J. biol. Chem. **109**, 325 (1955).

Elementaranalyse: ber.: C = 69,70%; gef.: C = 69,94%;
 $C_{19}H_{21}O_4N$ H = 6,46%; H = 6,58%;
 N = 4,28%; N = 4,68%.

α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrobromid: 8,6 g einer gesättigten Lösung von HBr in Eisessig (36proz.) wurden mit 2,8 g Carbobenzoxy- α -aminoisobuttersäurebenzylester versetzt. Die Reaktionsmischung blieb unter gelegentlichem Schütteln etwa eine halbe Stunde stehen, wobei CO_2 -Entwicklung erfolgte. Dann wurden 85 cm³ abs. Äther dem Gemisch zugefügt, das nach einiger Zeit ausgeschiedene α -Aminoisobuttersäurebenzylesterhydrobromid abfiltriert und mit abs. Äther gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Äther wurden das Hydrobromid in Form farbloser Kristalle erhalten. F. 147 °C.

Ausbeute: 87% d. Th.

Elementaranalyse: ber.: C = 48,19%; gef.: C = 48,48%;
 $C_{11}H_{16}O_2HBr$ H = 5,88%; H = 5,80%;
 N = 5,11%; N = 5,33%.

N,N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure-benzylester):

a) 3 g (0,0106 Mol) 1,4-Di-[4,4-dimethyloxazon-(5)-yl-(2)]-butan¹⁴ (F. 112–113 °C) wurden in 50 cm³ abs. Pyridin gelöst und mit 4,1 g (0,0212 Mol) freiem α -Aminoisobuttersäurebenzylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Stunden unter Rückfluß gekocht und das Pyridin im Vakuum abdestilliert. Der zurückbleibende Rückstand wurde aus Essigester umkristallisiert. Farblose Kristalle vom F. 176–179 °C.

Ausbeute: 1,8 g (25,8% d. Th.).

b) Einer Lösung von 1,28 g (0,004 Mol) N,N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäure)¹⁴ (F. 234 °C) in 20 cm³ Dimethylformamid wurden 1,7 g (0,008 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt. Die Reaktionsmischung blieb 24 Stunden unter gelegentlichem Schütteln stehen. Der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, das Filtrat mit einer Lösung von 1,55 g (0,008 Mol) freiem α -Aminoisobuttersäurebenzylester in 10 cm³ Dimethylformamid versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand aus Essigester umkristallisiert. F. 176 bis 179 °C.

Ausbeute: 300 mg (11,2% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 64,84%; gef.: C = 64,60%;
 $C_{36}H_{50}O_8N_4$ H = 7,56%; H = 7,56%;
 N = 8,41%; N = 8,63%.

1,4-Di-[4,4-dimethyloxazon-(5)-yl-(2)]-butan: Bei der Darstellung nach b) aus N,N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäure) und Dicyclohexylcarbodiimid wird als Zwischenprodukt 1,4-Di-[4,4-dimethyloxazon-(5)-yl-(2)]-butan gebildet. In einem Parallelversuch wurde es nach dem Abfiltrieren vom Dicyclohexylharnstoff und vor der Zugabe von α -Aminoisobuttersäurebenzylester durch Einengen im Vakuum isoliert. F. 110 °C (aus Benzol).

Elementaranalyse: ber.: C = 60,0%; gef.: C = 60,18%;
 $C_{14}H_{20}O_4N_2$ H = 7,14%; H = 7,30%;
 N = 10,0%; N = 10,43%.

N,N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäure): 0,85 g (0,00128 Mol) N,N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobutyryl- α -aminoisobuttersäurebenzylester) wurden in

¹⁴) G. FAUST, Dissertation, Halle 1956.

50 cm³ Methanol gelöst und mit einigen Tropfen Eisessig versetzt. Unter Verwendung von Palladium-Mohr¹⁵⁾ wurde hydriert. Nach 10 Minuten war die berechnete Menge Wasserstoff verbraucht. Der Katalysator wurde abfiltriert. Nach einiger Zeit begann die Abscheidung der in Methanol schwer löslichen N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobutryl- α -aminoisobuttersäure). Sie ist in Wasser, Alkohol und den üblichen organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich, dagegen in Dimethylformamid löslich. Aus verdünnter Bicarbonatlösung kann sie mit verdünnter Salzsäure umgefällt werden. F. 238–239 °C.

Ausbeute: 0,45 g (73% d. Th.). Die Analysenprobe wurde bei 150 °C und 15 Torr getrocknet.

Elementaranalyse: ber.:	C = 53,32%;	gef.:	C = 53,10%;
C ₂₂ H ₃₈ N ₄ O ₈ · ½ H ₂ O	H = 7,93%;	H = 8,05%;	
	N = 11,31%;	N = 11,30%.	

N.N'-Adipoyl-bis-(α -aminoisobuttersäuremethylester): Zu einer Lösung von 9,7 g (0,053 Mol) Adipinsäuredichlorid in 150 ml Essigester wurden unter Eiskühlung und Rühren 12,4 g (0,106 Mol) freier α -Aminoisobuttersäuremethylester (Kp.₂₀ = 45 °C) und 10,8 g (0,106 Mol) Triäthylamin zugetropft. Die Mischung wurde noch 30 Minuten im Eisbad gerührt. Nach 3 Stunden wurde sie zum Sieden erhitzt und vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert. Aus dem Filtrat wurden derbe farblose Kristalle erhalten. F. 158–159 °C (aus Essigester).

Ausbeute: 60% d. Th.

Elementaranalyse: ber.:	C = 55,80%;	gef.:	C = 55,79%;
C ₁₆ H ₂₈ O ₆ N ₂	H = 8,20%;	H = 8,20%;	
	N = 8,13%;	N = 8,30%.	

N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninäthylester): 12 g Adipinsäure-dihydrazid (F. 178 °C) wurden in einer Mischung von 600 cm³ Wasser, 220 cm³ Eisessig und 120 cm³ 5 n-HCl gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden 12 g Natriumnitrit in 50 cm³ Wasser innerhalb von 10 Minuten unter Rühren zugetropft, 10 Minuten weitergerührt und 100 cm³ kaltes Chloroform zugefügt. Die Chloroformschicht wurde abgetrennt und die wäßrige Schicht mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten und getrockneten Chloroformextrakte wurden mit der Lösung von 11,7 g (0,1 Mol) D.L-Alaninäthylester (Kp.₁₈ = 57 °C) in 20 cm³ Chloroform vereinigt und über Nacht stehen gelassen. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit Essigester aufgeköcht. Farblose Kristalle vom F. 106,5–107 °C (aus Essigester).

Elementaranalyse: ber.:	C = 55,80%;	gef.:	C = 55,28%;
C ₁₆ H ₂₈ O ₆ N ₂	H = 8,20%;	H = 8,28%;	
	N = 8,13%;	N = 8,30%.	

N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninhydrazid): 12 g Adipinsäurehydrazid wurden wie bei der Darstellung von N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanin-äthylester) zur Reaktion gebracht, nur wurde der Rückstand nicht in Essigester, sondern in 150 cm³ abs. Alkohol gelöst und mit 15 g 95–100proz. Hydrazinhydrat 30 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach 3 Tagen wurde das ausgeschiedene N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninhydrazid) abgetrennt und aus Wasser-Alkohol umkristallisiert. F. 215–216 °C. Ausbeute: 9,3 g (58,9% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.:	C = 45,50%;	gef.:	C = 45,48%;
C ₁₂ H ₂₄ O ₄ N ₆	H = 7,64%;	H = 7,70%;	
	N = 26,57%;	N = 25,83%.	

¹⁵⁾ J. TAUSZ u. N. v. PUTNOKY, Ber. dtsch. chem. Ges. **52**, 1576 (1919).

N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid): 2,62 g (0,015 Mol) Adipinsäuredihydrazid wurden in Adipinsäurediazid überführt. Die Lösung des Diazids in Chloroform wurde mit einer Lösung von 0,024 Mol freiem L-Histidinmethylester¹⁶⁾ in 20 cm³ Chloroform vereinigt, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und ein zum Teil schon vorher abgeschiedenes Öl erhalten, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Deshalb wurde N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinmethylester) in 40 cm³ abs. Methanol gelöst und die Lösung unter Eiskühlung mit Ammoniak gesättigt. Der fest verschlossene Kolben blieb 3–4 Tage stehen. Bereits nach 2 Tagen begann die Abscheidung vom N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinamid). Es wurde abgetrennt und aus Wasser-Alkohol umkristallisiert. F. 199–200 °C (unter Aufschäumen).

Ausbeute: 3,3 g (66% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 50,58%; gef.: C = 50,28%;
 $C_{18}H_{26}O_4N_8 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ H = 6,37%; H = 6,48%;
 N = 26,22%; N = 26,43%.

N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinhydrazid): Der sirupöse N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinmethylester) wurde in 40 cm³ abs. Alkohol gelöst, mit 3,7 cm³ 95–100proz. Hydrazinhydrat versetzt und 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach 3–4tägigem Stehen wurde das ausgeschiedene N.N'-Adipoyl-bis-(L-histidinhydrazid) abgetrennt und aus Alkohol-Wasser umkristallisiert. F. 185–187 °C (Zersetzung).

Ausbeute: 2,7 g (50,2% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 47,26%; gef.: C = 46,91%;
 $C_{18}H_{28}O_4N_{10} \cdot \frac{1}{2} H_2O$ H = 6,39%; H = 6,53%;
 N = 30,62%; N = 30,21%.

N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid): 4,83 g (0,015 Mol) N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninhydrazid) wurden in einer Mischung von 128 cm³ Wasser, 47,2 cm³ Eisessig und 25,8 cm³ 5 n-HCl gelöst. Zu der auf 0° gekühlten Lösung wurden 2,62 g Natriumnitrit in 10 cm³ Wasser innerhalb von 10 Minuten unter Rühren zugetropft, 10 Minuten weitergerührt und 21,5 cm³ Chloroform zugefügt. Die Chloroformschicht wurde abgetrennt und die wäßrige Schicht mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten getrockneten Chloroformextrakte wurden mit 0,024 Mol freiem L-Histidinmethylester in 20 cm³ Chloroform vereinigt, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und ein Sirup erhalten, der nicht kristallisierte. Der Sirup wurde in 40 cm³ abs. Methanol aufgenommen und mit trockenem Ammoniak unter Eiskühlung gesättigt. Der fest verschlossene Kolben blieb 3–4 Tage stehen. Das ammoniakalische Methanol wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in abs. Alkohol unter Erwärmen gelöst. Nach 2 Tagen wurde das ausgeschiedene N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) abgetrennt, in Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert und zur Trockene im Vakuum wieder eingengt. Aus abs. Alkohol wurde ein amorphes, hygroskopisches Pulver erhalten. F. 175 bis 180 °C (unter Aufschäumen).

Ausbeute: 1,8 g (27% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 50,60%; gef.: C = 50,48%;
 $C_{24}H_{36}O_6N_{10} \cdot \frac{1}{2} H_2O$ H = 6,55%; H = 6,60%;
 N = 24,59%; N = 24,08%.

¹⁶⁾ R. F. FISCHER u. R. R. WHETSTONE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5076 (1954); G. HILLMANN, Z. Naturforschg. **1**, 682 (1946).

N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinhydrazid): Der bei Anwendung von 0,015 Mol N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alaninhydrazid) als Sirup erhaltene N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidin-methylester) wurde in 40 cm³ abs. Alkohol gelöst, mit 3,7 cm³ 95–100proz. Hydrazinhydrat versetzt und 15 Minuten am Rückfluß gekocht. Der verschlossene Kolben blieb 3–4 Tage stehen. Das ausgeschiedene Hydrazid wurde abgetrennt und wie N.N'-Adipoyl-bis-(D.L-alanyl-L-histidinamid) umgefällt. Hygroskopische, farblose, amorphe Substanz. F. 185–190 °C (Zersetzung).

Ausbeute: 2,5 g (35,2% d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C = 48,07%; gef.: C = 48,03%;

C₂₄H₃₈O₆N₁₂ · $\frac{1}{2}$ H₂O H = 6,56%; H = 6,67%;

 N = 28,03%; N = 27,71%.

Bestimmung des Cu²⁺-Bindungsvermögens

Die Bestimmung des Cu²⁺-Bindungsvermögens erfolgte nach der Methode von G. WOLFF, S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER⁸⁾.

Für die Messungen wurde ein PULFRICH-Photometer (Zeiss, Jena) mit Spektralfilter S 53 (Filterschwerpunkt bei 5330 Å) benutzt. Die p_H-Messungen wurden mit dem p_H-Messgerät Typ 190 und einer Meßkette (hochohmige Glaselektrode und Kalomelektrode) durchgeführt. Die Elektrodenfunktion wurde wiederholt überprüft. Nach Aufstellung der Eichkurve einer [Fe (Dipy)₂]²⁺-Lösung im Konzentrationsbereich von 1 · 10⁻⁵–6 · 10⁻⁵ Mol/1000 cm³ wurde in Kontrollversuchen gefunden, daß bei den gewählten Konzentrationen der Komplexbildner die [Fe (Dipy)₃]²⁺-Konzentration nicht verändert wird.

Das Cu²⁺-Bindungsvermögen wurde im Acetatpuffer bei einem konstanten p_H von 5,2 ermittelt. Die Messungen wurden bei einer Konzentration von 1 · 10⁻³–15 · 10⁻³ molar an Histidin, N.N'-Adipoyl-bis-histidinamid oder N.N'-Adipoyl-bis-(alanyl-histidinamid) durchgeführt.

Bestimmung der Katalaseaktivität

Nach der von W. LANGENBECK, H. MIX und W. TITTELBACH-HELMRICH²⁾ angegebenen Methode wurde die Katalaseaktivität bestimmt. 2 · 10⁻⁴ Mol (bzw. 1 · 10⁻⁴, 1,5 · 10⁻⁴ und 3 · 10⁻⁴ Mol) der zu prüfenden Histidinderivate wurden in 90 cm³ kohlenstoffreiem Wasser gelöst und 5 cm³ einer 2 · 10⁻² m CuSO₄-Lösung zugesetzt. Das Meßgefäß befand sich in einem Bad von 20 ± 0,1 °C. Unter magnetischer Rührung wurde mit n/10 NaOH unter Verwendung einer p_H-Meßanlage der p_H-Wert eingestellt und auf 100 cm³ aufgefüllt. Nach 30 Minuten wurden 10 cm³ 1 m H₂O₂ (aus stabilisatorfreiem 30proz. H₂O₂ durch Verdünnen mit kohlenstoffreiem Wasser) zugesetzt. Unmittelbar nach Zugabe und 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten später wurden je 5 cm³ entnommen und zu 20 cm³ 10proz. Schwefelsäure gegeben. Die H₂O₂-Konzentration wurde durch Titration mit n/10 KMnO₄-Lösung bestimmt. Der p_H-Wert wurde während des Versuchs auf ± 0,1 konstant gehalten. Jede Versuchsreihe wurde viermal durchgeführt. Bei der graphischen Darstellung wurden die Mittelwerte von vier Einzelversuchen angegeben.

Herrn Prof. Dr. W. LANGENBECK möchten wir für sein förderndes Interesse sehr danken.

Halle, Justus-von-Liebig-Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Bei der Redaktion eingegangen am 9. Dezember 1959.