

# Ein Beitrag zur Konstitutionsermittlung von Peptiden I<sup>1</sup>.

V. Mitteilung über Peptide<sup>2</sup>.

Von

F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 11. Juni 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 19. Juni 1952.)

Die Konstitutionsbestimmung von Peptiden, d. h. die Feststellung der Reihenfolge der Aminosäuren, ist für die chemische Strukturbestimmung der Eiweißstoffe von großer Bedeutung. Besonders in jüngerer Zeit wurden mehrere Arbeiten dieser Frage gewidmet<sup>3, 4</sup>.

Obwohl dieses Problem durch die Entwicklung der Papierverteilungschromatographie in vielen Fällen eine weitgehende Lösung erfahren hat<sup>4</sup>, besitzen auch andere Methoden — besonders als Ergänzung und in Verbindung mit dieser Arbeitsweise — zweifellos noch bedeutendes Interesse. Die meisten derartigen Methoden laufen darauf hinaus, die Aminosäure<sup>5</sup> eines Peptides chemisch zu markieren und nach Hydrolyse des Peptides die so gekennzeichnete Aminosäure zu isolieren und zu identifizieren. Bis auf ein wohl nur selten anwendbares Verfahren — Schmelzen eines Tripeptides mit  $\beta$ -Naphthol und Abspaltung von 2 Aminosäuren als Dioxopiperazin<sup>6</sup> — war es bisher immer nur möglich, eine Aminosäure aus einem Peptid abzuspalten<sup>3, 4</sup>.

Uns ist es nun gelungen, in einem einfachen Arbeitsgang die Aminosäure und die ihr benachbarte als Hydantoin abzuspalten. Hierüber soll im folgenden berichtet werden:

<sup>1</sup> Vorläufige Mittlg.: Nature (London) **169**, 708 (1952).

<sup>2</sup> <sup>4</sup> Mittlg.: K. Schlögl, F. Wessely und G. Korger, Mh. Chem. **83**, 845 (1952).

<sup>3</sup> Zusammenfassende Übersicht bis 1945: S. W. Fox, Adv. Protein Chem. **II**, 155 (1945).

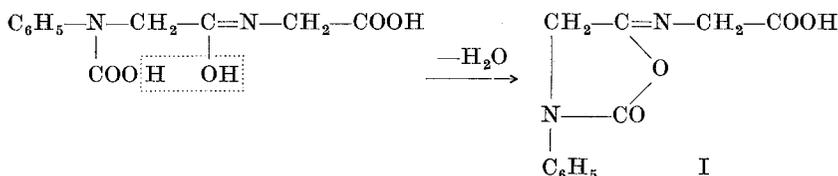
<sup>4</sup> 1945 bis 1951: K. Schlögl, Österr. Chem.-Ztg., im Druck.

<sup>5</sup> Nach einem Vorschlag von S. W. Fox, loc. cit., wollen wir die Aminosäure, die die freie Aminogruppe eines Peptides trägt, als Aminosäure, die mit der freien Carboxylgruppe als Aminosäure bezeichnen.

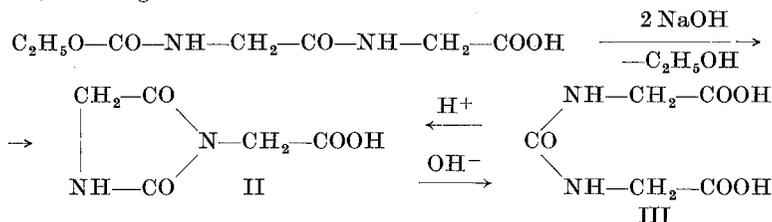
<sup>6</sup> N. Lichtenstein, J. Amer. chem. Soc. **60**, 560 (1938).

*E. Fischer*<sup>7</sup> hatte im Zuge seiner Studien über Peptidsynthesen durch Kupplung von N-Carbäthoxy-aminosäure-chloriden mit Aminosäuren und Peptiden N-Carbäthoxy-peptide dargestellt. Durch alkalische Verseifung hoffte er über die unbeständigen Peptid-N-carbonsäuren durch CO<sub>2</sub>-Abspaltung zu den freien Peptiden zu gelangen. Diese Hoffnung erfüllte sich jedoch nicht; wider Erwarten verblieb ein Mol CO<sub>2</sub> im Molekül und *Fischer* nahm an, daß es sich um die freien Peptid-N-carbonsäuren handelte. Durch Verestern dieser Verbindungen gelangte man aber nicht wieder zu den N-Carbäthoxy-peptidestern, von denen man ausgegangen war, sondern erhielt von diesen verschiedene Ester, die *Fischer* als Verbindungen der  $\beta$ -Reihe bezeichnete. Die beständigen „Peptid-N-carbonsäuren“ sollten sich — und analog alle Derivate der  $\beta$ -Reihe — von den normalen  $\alpha$ -Verbindungen durch die Enolisierung der Peptidbindung unterscheiden. Damit wurde auch die Stabilität der N-Carbonsäuren erklärt.

*H. Leuchs* befaßte sich in mehreren Arbeiten<sup>8</sup> mit solchen „Peptid-N-carbonsäuren“ von Glycin- und N-Phenyl-glycin-peptiden und erklärte die Verhältnisse ebenso wie *Fischer* durch Enolisierung der der Aminosäure benachbarten Peptidbindung. In manchen Fällen konnte er die „Peptid-N-carbonsäuren“ nicht als solche fassen, sondern nur als sog. „Lactonsäuren“ (I), die durch intramolekulare Wasserabspaltung zwischen der N-Carboxylgruppe und der enolisierten Peptidbindung entstanden sein sollten. *Leuchs* diskutiert zwar die Möglichkeit einer Hydantoinstruktur, lehnt diese aber ohne Angabe von Beweisen ab.



In mehreren Arbeiten konnte einer von uns (*F. W.*)<sup>9</sup> eindeutig beweisen, daß es sich bei der von *Fischer* beschriebenen „Glycyl-glycin-N-carbonsäure“ um das Carbonyl-bis-glycin III handelt. Das Schema, das für den Verlauf der alkalischen Verseifung des Carbäthoxydiglycins aufgestellt worden war und das dann auch für die anderen Carbalkoxypeptide als gültig erkannt wurde, war folgendes:

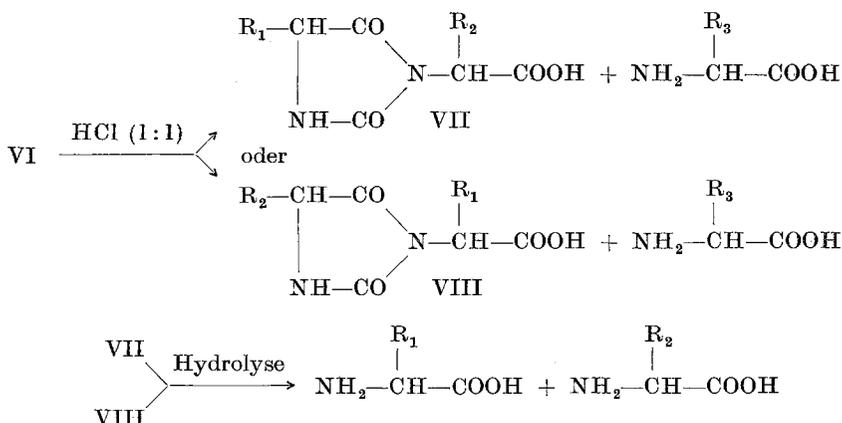


<sup>7</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 2094 (1903).

<sup>8</sup> *H. Leuchs* und *W. Manasse*, Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 3235 (1907). — *H. Leuchs* und *F. B. La Forge*, ebenda **41**, 2586 (1908). — *H. Leuchs* und *P. Sander*, ebenda **58**, 1528 (1925).

<sup>9</sup> *F. Wessely* und *E. Kemm*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **174**, 306 (1928). — *F. Wessely*, *E. Kemm* und *J. Mayer*, ebenda **180**, 64 (1929). — *F. Wessely* und *J. Mayer*, Mh. Chem. **50**, 439 (1928).





Das Peptid wird in üblicher Weise in sein Carbalkoxy-derivat IV übergeführt. Dieses liefert beim Erwärmen mit 2 Mol Alkali über die intermediär entstehende Verbindung V (solche Verbindungen wurden von uns als Hydantoinpeptide bezeichnet und in größerer Zahl dargestellt<sup>12</sup>) das Carbonyl-aminosäure-peptid VI · VI spaltet bei Behandlung mit HCl in der Siedehitze glatt ein substituiertes Hydantoin (VII oder VIII) ab, das sich aus den Aminosäuren 1 und 2 aufbaut. Dieses kann von der Aminosäure 3 durch Ätherextraktion leicht abgetrennt werden. Energische Hydrolyse des Hydantoins und anschließende Papierchromatographie ergibt die Aminosäuren 1 und 2, während 3 sich in der vom Hydantoin befreiten wäßr. Lösung befindet und ebenfalls papierchromatographisch identifiziert werden kann.

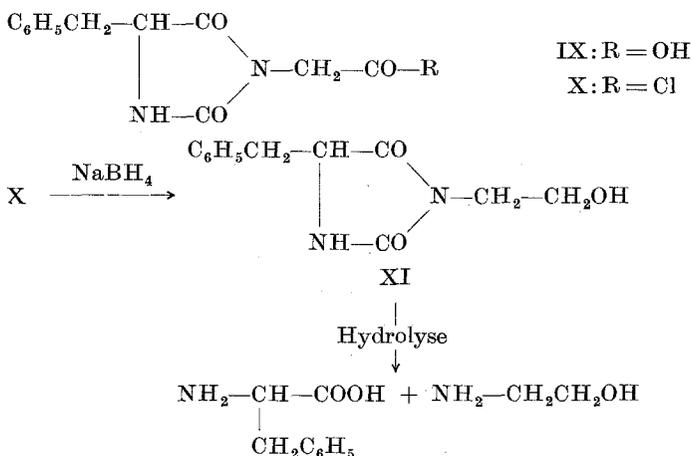
Leider läßt sich über die Konstitution des Hydantoins, das bei der Säurebehandlung von VI entsteht, im vornherein nichts Sicheres aussagen (VII oder VIII), da, wie weiter unten näher ausgeführt werden wird, diese im wesentlichen von der Größe der Reste R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> abhängt, die von Peptid zu Peptid variiert.

Da es uns nämlich mit der im folgenden zu besprechenden Methode gelang, die Konstitution eines aus zwei verschiedenen Aminosäuren aufgebauten Hydantoins zu ermitteln, könnte man, wenn der Ringschluß zum Hydantoin immer nur in einer Richtung, etwa VI nach VII erfolgen würde, wie dies in den von uns bisher untersuchten Beispielen der Fall war, gleichzeitig mit der Bestimmung der Aminosäuren 1 und 2 auch die Feststellung treffen, welche der beiden die Aminosäure des Peptides darstellt.

Diese Methode zur Konstitutionsbestimmung eines Hydantoins sei am Beispiel der 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure IX erläutert, die aus Phenylalanin und Glycin aufgebaut ist. Wird das Säurechlorid X, das

<sup>12</sup> K. Schlögl, F. Wessely und G. Korger, Mh. Chem. 83, 493 (1952).

mit Thionylchlorid leicht erhältlich ist, der Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  unterworfen, so entsteht der Hydantoinalkohol XI<sup>12</sup>. Dieser wird hydrolysiert, dem Hydrolysat der Aminoalkohol — im vorliegenden Fall Colamin — durch Ätherextraktion entzogen und die unveränderte Aminosäure (Phenylalanin) papierchromatographisch identifiziert — während Glycin fehlt.



$\text{NaBH}_4$  wurde als Reduktionsmittel deshalb gewählt, weil  $\text{LiAlH}_4$  schon unter milden Bedingungen auch den Hydantoinring unter Reduktion zumindest einer CO-Gruppe angreift, wie *I. J. Wilk* und *W. J. Close*<sup>13</sup> zeigen konnten. Tatsächlich führte auch in unserem Fall Reduktion mit  $\text{LiAlH}_4$  sowohl des Hydantoins IX, als auch des entsprechenden Esters nicht zum Ziel. Ebenso wenig war für unseren Zweck, also die Konstitutionsermittlung eines Hydantoins, Oxydation mit Bleitetraacetat oder mit Hypobromit erfolgreich.

Die neue Methode zur Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten wurde zuerst am Diglycyl-glycin erprobt. Wir erhitzen die von *Fischer* beschriebene<sup>14</sup> „Diglycyl-glycin-N-carbonsäure“, VI ( $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$ ), die auch *V. Cerchez*<sup>15</sup> noch als solche anspricht, mit Salzsäure (1 : 1) 2 Stdn., dampften im Vak. zur Trockene, nahmen den Rückstand in Wasser auf und extrahierten mit Äther. Dabei erhielten wir in 75%iger Ausbeute die Hydantoin-3-essigsäure II. Damit war auch der endgültige Beweis erbracht, daß es sich bei dem *Fischerschen* Produkt nicht um die „Diglycyl-glycin-N-carbonsäure“, sondern um das Carbonyl-(glycin)-(glycyl-glycin) (Gly-CO-Gly-Gly) handelt, da nur aus diesem bei der Hydrolyse die Hydantoin-3-essigsäure entstehen kann.

<sup>13</sup> J. Org. Chem. 15, 1020 (1950).

<sup>14</sup> Ber. dtsch. Chem. Ges. 36, 2094 (1903).

<sup>15</sup> Bull. Soc. chim. France (4) 49, 324 (1931).

Das abgespaltene Glycin (Aminosäure 3) befand sich in der extrahierten wäßr. Schicht und konnte papierchromatographisch identifiziert werden.

Es ist also — auch im Hinblick auf die Ergebnisse bei den anderen von uns untersuchten Peptiden — als sicher anzunehmen, daß es sich bei allen in der älteren Literatur beschriebenen „Peptid-N-carbonsäuren“<sup>16</sup> um Carbonyl-aminosäure-peptide der allgemeinen Formel VI bzw. um Carbonyl-bisaminosäuren (bei Dipeptid-N-carbonsäuren) handelt.

Als nächstes Beispiel wählten wir das DL-Leucyl-glycyl-DL-phenylalanin, welches infolge der 3 verschiedenen am Aufbau beteiligten Aminosäuren als besonders geeignet schien, den neuen Abbau zu studieren.

Das Peptid wurde nach *H. Leuchs* und *U. Suzuki* dargestellt<sup>17</sup>. Die Gewinnung der nicht beschriebenen N-Carbäthoxyverbindung verlief ohne Schwierigkeiten. Durch 3stündiges Erhitzen mit 2 Mol Alkali erzielten wir die Umlagerung zum Carbonyl-(leucin)-(glycyl-phenylalanin) XII (Leu-CO-Gly-Phe), das roh durch Äquivalentgewichtsbestimmung identifiziert wurde. Es gelang aber auch, durch einmaliges Umlösen aus Wasser, wobei nur kurz erhitzt wurde, die Verbindung analysenrein zu erhalten. Beim öfteren Umlösen aus Wasser und besonders beim längeren Erhitzen der wäßr. Lösung änderten sich die Analysenwerte, was durch partiellen Ringschluß zum Hydantoinpeptid XIII zu erklären ist.

Beim Behandeln von XII mit HCl in der Hitze erhielten wir das Hydantoin XV, das sich infolge seiner schlechten Wasserlöslichkeit leicht abtrennen ließ, während die wäßr. Mutterlauge das Phenylalanin enthielt, das papierchromatographisch rein, d. h. frei von Glycin und Leucin war.

Es waren zunächst die beiden möglichen Hydantoine XV und XVII zu erwarten. Auf Grund der *Leuchsschen* Versuche<sup>8</sup> sowie der Tatsache, daß Carbonyl-bisaminoverbindungen in saurer Lösung leicht die entsprechenden Hydantoine liefern<sup>18</sup>, schien es wahrscheinlich, daß unter dem Einfluß der H-Ionen zunächst Ringschluß zum Hydantoinpeptid XIII erfolgt, das sekundär in das Hydantoin XV und Phenylalanin gespalten wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß primär zumindest ein Teil von XII in Carbonyl-(glycin)-(leucin) XVI und Phenylalanin verseift wird. Jedoch auch bei XVI erscheint in diesem Fall, wo R<sub>1</sub> (Isobutyl) größer als R<sub>2</sub> (H) ist, der Ringschluß zum Hydantoin XV wahrscheinlicher, da ja die Bildung von am C-Atom 5 substituierten Hydantoinen bevorzugt erfolgt<sup>18</sup>.

<sup>16</sup> *H. Leuchs*, loc. cit. und z. B. auch *L. Havestadt* und *R. Fricke*, Ber. dtsh. Chem. Ges. 57, 2048 (1924).

<sup>17</sup> Ebenda 37, 3306 (1904).

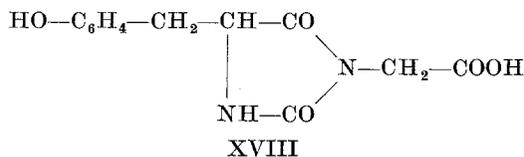
<sup>18</sup> *E. Ware*, Chem. Rev. 46, 403 (1950).



Zur Darstellung des freien Hydantoinpeptides wurden ausgehend von XII noch andere Methoden versucht. Bei der Behandlung von XII mit HCl-Gas in Nitromethan analog *P. Edman*<sup>19</sup> resultierte nur reines, unverändertes Ausgangsmaterial. Wie erwähnt, war es *H. Leuchs*<sup>8</sup> gelungen, durch oft nur kurzzeitiges Erwärmen der aus Glycin und N-Phenyl-glycin aufgebauten „Peptid-N-carbonsäuren“ mit verd. HCl zu den „Lactonsäuren“, also den Hydantoinpeptiden zu gelangen. Wir konnten hingegen beim halbstünd. Erhitzen mit 0,1 und 0,3 n HCl wohl teilweisen Ringschluß erzielen, wie sich aus den Analysendaten ergab, jedoch ging damit bereits eine Abspaltung von Phenylalanin parallel.

Es gelang also auf diesem Weg nicht, XIII rein zu erhalten. Die *Leuchs*schen Ergebnisse erklären sich zwanglos aus der Tatsache, daß N-substituierte Hydantoinensäuren sehr instabil sind und äußerst leicht Ringschluß zu den entsprechenden Hydantoinen erleiden<sup>18</sup>.

Um die Anwendungsbreite der neuen Methode kennenzulernen, führten wir den Abbau mit 0,1 Millimol N-Carbäthoxy-leucyl-glycyl-phenylalanin in der oben angegebenen Weise, jedoch ohne Isolierung und Reinigung der Zwischenstufen durch. Es zeigte sich, daß auch hier die Ergebnisse völlig eindeutig waren. Hydantoin XV wurde nach Hydrolyse von XII der wäßr. Lösung durch Ätherextraktion entzogen, die nur mehr Phenylalanin enthielt, während das Hydantoin nach Druckhydrolyse im Papierchromatogramm ausschließlich Glycin und Leucin ohne Spuren von Phenylalanin zeigte.



Es schien interessant, festzustellen, ob auch die N-Carbobenzyloxy-(Cbzo-)peptide, die ja in der Peptidchemie eine überaus große Rolle spielen, mit Alkali ebenfalls die Umlagerung zu den Carbonyl-amino-säure-peptiden erleiden würden. Von N-Cbzo-dipeptiden waren ja bereits drei Fälle — wie erwähnt — bekannt<sup>11</sup>. Zu diesem Zweck haben wir den N-Cbzo-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester nach *M. Bergmann* und *J. S. Fruton*<sup>20</sup> und den bisher noch nicht beschriebenen N-Cbzo-L-tyrosyl-glycyl-DL-phenylalanin-äthylester durch Kupplung von N-Cbzo-L-tyrosin-azid mit Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester dargestellt. Wir wählten gerade diese beiden Peptide, da die beim Abbau zu erwartende 5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure XVIII bereits bekannt war<sup>21</sup> und daher gute Vergleichsmöglichkeiten bestanden. Die Carbonylbisaminoverbindungen, die durch 2stündiges Erwärmen mit 3 Mol Alkali erhalten worden waren, wurden nicht weiter gereinigt, da alle Versuche,

<sup>19</sup> Acta chem. Scand. 4, 283 (1950).

<sup>20</sup> J. Biol. Chem. 118, 405 (1937).

sie umzulösen, fehlschlagen, wie überhaupt die meisten Carbonyl-amino-säurepeptide zum Unterschied von den Hydantoinpeptiden wenig kristallisationsfreudige Substanzen darstellen. Die Äquivalentsgewichtsbestimmung der Rohprodukte lieferte etwas zu hohe Werte, was durch teilweisen Ringschluß zum Hydantoin erklärt werden kann. Behandlung mit HCl in der Hitze und anschließende Ätherextraktion lieferte in beiden Fällen zirka 70% d. Th. eines Hydantoins, das in seinen Eigenschaften völlig mit dem in der Literatur beschriebenen Produkt XVIII übereinstimmte. Druckhydrolyse lieferte Glycin und Tyrosin. Zur weiteren Charakterisierung wurde noch der Äthylester dargestellt, der seinem Verhalten nach ebenfalls mit dem beschriebenen Ester von XVIII<sup>21</sup> identisch war.

Veresterungsversuche an beiden Carbonyl-amino-säure-peptiden (Tyr-CO-Gly-Gly und Tyr-CO-Gly-Phe) mit äthanol. HCl führten zu folgenden Ergebnissen: Tyr-CO-Gly-Gly ergab nach 15 Min. Behandlung in der Wärme ein Gemisch von Estern, die durch fraktionierte Kristallisation aus Äther-Äthanol zum Teil getrennt werden konnten. Der eine Ester schmolz von 195 bis 196° und war mit dem Ester von XVIII identisch, während sich die tiefer schmelzende Fraktion (80 bis 85°) als Diäthylester von Tyr-CO-Gly-Gly erwies. Das Papierchromatogramm der Mutterlauge zeigte, daß eine beträchtliche Menge von Glycin als Ester abgespalten worden war, was mit obigen Befunden der Veresterung in gutem Einklang steht. Es ist also auch hier die Glycyl-Glycin-Bindung — wie in anderen Fällen schon öfter festgestellt worden war<sup>22</sup>, gegen heiße äthanol. HCl sehr empfindlich. Wurde aber das rohe Tyr-CO-Gly-Gly nur 5 Min. mit äthanol. HCl erhitzt, so war keine Abspaltung von Glycin zu beobachten und wir erhielten in guten Ausbeuten den Di-äthylester der Carbonylbisaminoverbindung Tyr-CO-Gly-Gly als Produkt vom Schmp. 83 bis 86°. Es scheint also nicht möglich, auf diesem Wege den Hydantoinpeptidester darzustellen, da einerseits die Glycyl-glycinbindung zu empfindlich, andererseits aber der erwähnte Diäthylester zum Unterschied von der analogen Verbindung Leu-CO-Gly-Phe keine so große Tendenz zum Ringschluß zeigt.

Beim Carbonyl-(tyrosin)-(glycyl-phenylalanin) (Tyr-CO-Gly-Phe) führte die Behandlung mit äthanol. HCl in der Hitze während 15 Min. zu einem Gemisch von Estern, welches nicht aufgetrennt werden konnte, nach der Äthoxylbestimmung aber zu etwa gleichen Teilen aus dem Di-äthylester von Tyr-CO-Gly-Phe und dem Hydantoinpeptidester bestand. Abspaltung von Phenylalanin war noch nicht zu bemerken, zeigte sich aber beim Erhitzen auf 30 Min. bereits in erheblichem Maße.

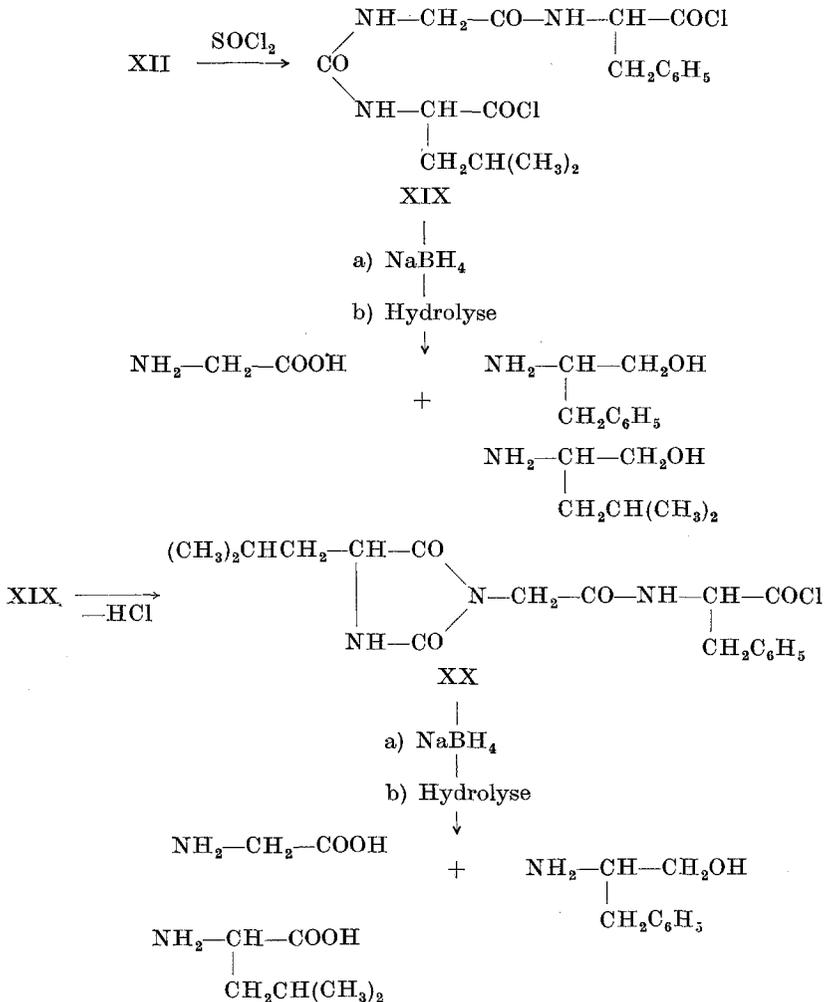
<sup>21</sup> T. B. Johnson und D. A. Hahn, J. Amer. chem. Soc. **39**, 1255 (1917).

<sup>22</sup> Siehe z. B.: E. Fischer und E. Fournéau, Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 2868 (1901).

Als letztes und fünftes Tripeptid zogen wir das bisher nicht beschriebene DL-Alanyl-glycyl-DL-phenylalanin in den Kreis unserer Untersuchungen. Es sollte hier, wie bereits beim Leucyl-glycyl-phenylalanin festgestellt werden, ob die neue Methode auch bei Verwendung von geringen Substanzmengen eindeutige Rückschlüsse auf die *Aminosäure* und die ihr benachbarte gestattet. Wir haben daher auch hier bewußt auf die Isolierung der Zwischenstufen verzichtet. Der N-Carbomethoxy-tripeptidester wurde durch Kupplung des N-Carbomethoxy-DL-alaninazides mit Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester dargestellt. Diese Kupplung gab nur mäßige Ausbeuten, was auf die leichte Löslichkeit des Azides in der wäßr. Diazotierungslösung zurückzuführen sein dürfte. Das Reaktionsprodukt war ein Glas, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Nach Hydrolyse lag im Papierchromatogramm Alanin, Glycin und Phenylalanin vor. Es schien daher im Verein mit den angewandten Reinigungsmethoden sicher, daß der gewünschte Ester vorlag.

Die Umwandlung in die Carbonyl-bisaminoverbindung Ala-CO-Gly-Phe wurde, wie üblich, durchgeführt. Da diese geringe Ninhydrinreaktion zeigte, wurde in Essigester aufgenommen und zur Entfernung von Spuren Aminosäuren und Peptiden mit verd. HCl durchgeschüttelt. Nach 2stünd. Behandlung mit HCl in der Hitze und anschließender Ätherextraktion war in der wäßr. Phase nur mehr Phenylalanin enthalten, das durch Spuren Glycin und Alanin verunreinigt war. Druckhydrolyse des in der Ätherschicht enthaltenen Hydantoins lieferte ein Gemisch von Glycin und Alanin ohne Spuren Phenylalanin.

Abschließend soll noch über eine neue Möglichkeit berichtet werden, zusätzlich zur Bestimmung der *Aminosäure* und der ihr benachbarten in einfachen Peptiden im selben Arbeitsgang auch die *Aminosäure* zu bestimmen. Zu diesem Zweck machten wir von der Reaktion Gebrauch, die uns auch — wie oben ausgeführt — dazu diente, die Konstitution eines Hydantoins zu ermitteln, nämlich die Reduktion des Säurechlorides mit  $\text{NaBH}_4$ . Die neue Methode wurde bisher nur am Leucyl-glycyl-phenylalanin erprobt, wo sie eindeutige Ergebnisse lieferte. Dazu wurde das Carbonyl-(leucin)-(glycyl-phenylalanin) XII mit  $\text{SOCl}_2$  behandelt und das Reaktionsprodukt mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert; hierauf wurde unter Druck hydrolysiert und dem Hydrolysat der gebildete Aminoalkohol durch Ätherextraktion entzogen. Im Papierchromatogramm fehlte nur Phenylalanin, was einen intermediären Ringschluß des Di-Säurechlorides XIX zum Chlorid des Hydantoinpeptides (XX) beweist. Aus diesem entsteht bei Reduktion und Hydrolyse Glycin und Leucin, während Phenylalanin zum Alkohol reduziert wurde. Wäre hingegen XIX reduziert worden, so müßte im Papierchromatogramm auch das zum Alkohol reduzierte Leucin fehlen.



Als wir im Modellversuch Carbonyl-bisglycin III der Behandlung mit  $\text{SOCl}_2$  unterwarfen und das Reaktionsprodukt mit Alkohol behandelten, war auch hier — wo zweifellos die geringste Tendenz zum Ringschluß zu erwarten ist — in der Hauptmenge Hydantoin-3-essigester neben wenig Carbonyl-bisglycinester entstanden. Dies stellt einen Beweis für den zu erwartenden leichten Ringschluß von Carbonyl-bisaminosäurechloriden zu den entsprechenden Hydantoinen dar, was mit obigem Befund in gutem Einklang steht.

#### Diskussion der Ergebnisse.

Wie aus den beim Abbau der fünf Tripeptide erhaltenen Ergebnissen hervorgeht, gestattet es die neue Methode, die Aminosäure und die ihr benachbarte eines Peptides in einem Arbeitsgang, dessen experimentelle

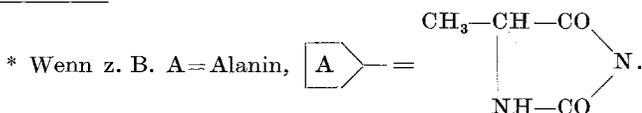
Durchführung sich als sehr einfach erwiesen hat, als Hydantoin abzuspalten. Es ist einleuchtend, daß sich das eingangs für Tripeptide angegebene Schema auf jedes höhere einheitliche Oligopeptid übertragen läßt, wenn sich auch der experimentellen Durchführung in manchen Fällen Schwierigkeiten entgegenstellen werden.

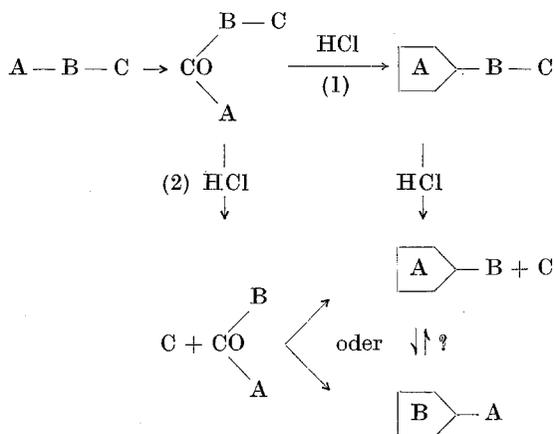
Die Carbalkoxylierung eines Peptides stellt eine Reaktion dar, die dessen Struktur wohl kaum verändern dürfte. Die anschließende Behandlung der Carbalkoxy-peptide mit Alkali in der Hitze führt nach den bisherigen Erfahrungen auf jeden Fall zu einer Carbonyl-bisamino-verbindung (*Aminosäure*-CO-peptid), an deren Aufbau die *Aminosäure* und die ihr benachbarte beteiligt sein müssen, gleichgültig, welche Veränderungen — besonders bei höheren Peptiden — durch das Alkali in der restlichen Kette hervorgerufen werden. Da diese Veränderungen vor allem in einer teilweisen Sprengung von Peptidbindungen bestehen werden, ist es notwendig, das Carbonyl-aminosäure-peptid auf die Anwesenheit von freien Aminosäuren bzw. Peptiden papierchromatographisch zu prüfen. Solche würden später stören und sind durch Lösen des Carbonyl-aminosäure-peptides in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Essig-ester) und Ausschütteln mit verd. HCl zu entfernen. Als noch einfacher hat sich die direkte Extraktion der sauren wäßr. Lösung dieser Verbindungen mit Äther erwiesen, wobei sie sofort frei von Aminosäuren und Peptiden anfallen.

Das so gereinigte *Aminosäure*-CO-peptid wird der Hydrolyse mit HCl (1 : 1) unterworfen. Die dabei gebildeten Hydantoinne sind durchwegs ätherlöslich, können daher durch Extraktion quantitativ aus dem Hydrolysat — ohne durch Aminosäuren verunreinigt zu sein — abgetrennt werden und liefern bei der Druckhydrolyse auf jeden Fall nur die *Aminosäure* und die ihr benachbarte.

Für die Feststellung der beiden amino-endständigen Aminosäuren ist es gleichgültig, welche der beiden möglichen Strukturen dem Hydantoin zukommt. Wenn auch in den von uns bisher untersuchten Fällen der Hydantoinringschluß nur in einer Richtung erfolgte und es daher möglich scheint, daraus die Reihenfolge der Aminosäuren 1 und 2 abzuleiten, so dürfen diese Ergebnisse aus folgenden Überlegungen nicht verallgemeinert werden.

Die verschiedenen Möglichkeiten der Hydantoinbildung soll nachstehendes Schema andeuten, in dem A, B und C die Aminosäurereste eines Tripeptides darstellen, während die Hydantoinne nur schematisch\* angedeutet sind.





1. Die Carbonyl-bisaminoverbindung kann primär zum Hydantoinpeptid ringschließen, was bevorzugt dann der Fall sein wird, wenn der Rest  $R_1$  der Aminosäure A groß ist gegen  $R_2$  von B. Dieses Hydantoinpeptid wird dann weiter in Hydantoin  $\boxed{\text{A}}\text{—B}$  und die Aminosäure C gespalten.

2. Andererseits kann aber primär aus  $\text{A—CO—B—C}$  C abgespalten werden, worauf der Ringschluß der entstehenden Carbonyl-bisaminosäure  $\text{A—CO—B}$  wieder von der „Schwere“ der Aminosäuren A und B abhängen wird.

Ist also der Rest der Aminosäure A groß gegen den von B, wie das bei den von uns bisher untersuchten Peptiden der Fall war, so wirken beide Effekte zusammen und es wird nur das Hydantoin  $\boxed{\text{A}}\text{—B}$  entstehen. Die anderen Fälle, d. h. wo B schwerer als A ist, sind das Ziel weiterer Untersuchungen. Hierbei ist auch eine Umlagerung primär entstehender, vielleicht instabiler Hydantoine in die stabilere Form nicht ausgeschlossen, die ebenfalls näher untersucht werden soll.

Einen Beweis für diese Überlegungen, daß der Ringschluß primär von der Größe der Reste abhängt, stellt auch die bereits früher erwähnte Behandlung von Cbz-di-peptidestern mit alkohol.  $\text{NH}_3$  dar, wobei in den Fällen von Cbz-phenylalanyl-glycinester, Cbz-methionyl-glycinester und Cbz-leucyl-glycinester jeweils die Amide der entsprechenden Hydantoine erhalten wurden<sup>11</sup>.

Berücksichtigt man die erwähnten Möglichkeiten, so folgt, daß der neue Abbau gegenwärtig nur erlaubt, Aussagen über die Aminosäure und die ihr benachbarte, nicht aber über ihre Reihenfolge im Peptid zu machen. Dies scheint jedoch auch nicht von allzugroßer Bedeutung, da es eine Reihe von Verfahren, vor allem *Sangers* DNP-Verfahren gibt<sup>3, 4</sup>, die zur Bestimmung der Aminosäure dienen können.

Auf die sterischen Verhältnisse, die in manchen Fällen (aktive und racemische Aminosäuren, verschiedene sterische Formen des Hydantoins) sehr kompliziert liegen, haben wir keine Rücksicht genommen, da diese Fragen für den von uns angestrebten Zweck ohne Bedeutung sind.

Wenn dieses neue Verfahren vielleicht auch nicht allgemein anwendbar sein dürfte, so scheint es uns doch eine Bereicherung der bisherigen Methoden zur Konstitutionsermittlung von Peptiden.

Es soll, ebenso wie die Methode zur Bestimmung der Aminosäure noch an anderen, auch höheren Peptiden erprobt werden, um seine Grenzen kennenzulernen. Hierüber wird später berichtet werden.

### Experimenteller Teil.

*Hydrolyse des 5-Benzyl-3-( $\beta$ -oxyäthyl)-hydantoins XI.* XI wurde, wie schon früher beschrieben<sup>12</sup>, aus 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure IX durch Chlorierung mit  $\text{SOCl}_2$  und Reduktion des Säurechlorides X mit  $\text{NaBH}_4$  dargestellt.

0,1 g XI haben wir mit 2 ml konz. HCl bei 150 bis 160° 5 Stdn. im Röhrchen erhitzt. Der Abdampfrückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit NaOH auf pH 8 gebracht und mit Äther im Apparat extrahiert. Die wäßr. Lösung wurde angesäuert, im Vak. eingedampft, der Rückstand mit absol Äthanol ausgekocht und die alkohol. Lösung nach Einengen papierchromatographiert. Dabei war nur Phenylalanin festzustellen, während Glycin fehlte.

### Abbau von Tripeptiden.

#### a) *Glycyl-glycyl-glycin.*

*Hydantoin-3-essigsäure* aus der Fischerschen „Diglycyl-glycin-N-carbonsäure“. 0,46 g der nach Fischer<sup>7</sup> dargestellten Verbindung wurden mit 20 ml HCl (1 : 1) 3 Stdn. zum Sieden erhitzt, die Lösung i. Vak. zur Trockene gedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und durch 20 Stdn. im Apparat mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung enthielt 0,22 g (71% d. Th.) Hydantoin-3-essigsäure vom Schmp. 199 bis 201<sup>23</sup>, die mit einer authentischen Probe im Mischschmp. keine Depression gab. Die wäßr. Lösung lieferte 0,20 g Rückstand, der sich papierchromatographisch als Glycin erwies.

#### b) *DL-Leucyl-glycyl-DL-phenylalanin.*

*N-Carbäthoxy-DL-leucyl-glycyl-DL-phenylalanin.* 3,2 g Tripeptid<sup>17</sup> lösten wir in 10 ml 1 n NaOH (1 Mol) und versetzten unter Köhlen und Schütteln abwechselnd mit 1,1 g Äthylchlorkohlensäureester (1,1 Mol) und einer verd. Sodalösung. Nach  $\frac{3}{4}$  Stdn. Schütteln wurde mit verd. HCl angesäuert, vom ölig ausfallenden Niederschlag abdekantiert, dieser in Äthanol gelöst und mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 2täg. Stehen bei 0° hatten sich Kristalle abgeschieden. Ausbeute: 2,7 g (70% d. Th.). Aus Äthanol-Wasser. Schmp.: 155 bis 158° (Zers.)

$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{N}_3$ . Ber. C 58,96, H 7,17, Äqu.-G. 407. Gef. C 59,32, H 7,26, Äqu.-G. 410.

<sup>23</sup> Sämtliche Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt.

*Carbonyl-(DL-leucin)-(glycyl-DL-phenylalanin)*. (XII). 1 g obiger Carboäthoxyverbindung wurde in 5,3 ml 1 n NaOH (2,1 Mol) gelöst und 3 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt. Das nach dem Neutralisieren mit der äquivalenten Menge n-HCl ausfallende zähe Öl brachten wir durch Erwärmen und Zusatz von Wasser in Lösung, kochten 1mal mit Tierkohle auf, filtrierten und kühlten rasch ab. Dabei schieden sich nach einigem Stehen 0,6 g (65% d. Th.) Kristalle ab. Schmp.: 178 bis 180° (Zers.).

$C_{18}H_{25}O_6N_3$ . Ber. C 56,98, H 6,64, Äqu.-G. 189,6. Gef. C 57,03, H 6,64, Äqu.-G. 192.

Nach 2maligem Umlösen aus Wasser: Schmp.: 179 bis 181° (Zers.).

Gef. C 57,88, H 6,13. Ber. für das Hydantoinpeptid XIII  $C_{18}H_{23}O_5N_3$  C 59,82, H 6,41.

*5-Isobutyl-hydantoin-3-essigsäure* (XV). 0,5 g XII wurden mit 20 ml HCl (1 : 1) 3 Stdn. in der Siedehitze behandelt, i. Vak. zur Trockene gebracht, in wenig Wasser aufgenommen und vom ungelösten Hydantoin abgesaugt. Ausbeute: 0,19 g (68% d. Th.).

Aus Wasser Blättchen. Schmp.: 183 bis 185°.

$C_9H_{14}O_4N_2$ . Ber. C 50,44, H 6,58. Gef. C 50,23, H 6,71.

In der Mutterlauge befand sich papierchromatographisch reines Phenylalanin.

*N-(5-Isobutyl-hydantoin-3-acetyl)-DL-phenylalanin-äthylester* (XIV). 0,2 g XII, gelöst in 10 ml absol. Äthanol, sättigten wir unter Kühlung mit HCl-Gas und erhitzen anschließend 15 Min. zum Sieden. Das nach dem Abdampfen i. Vak. verbleibende Öl, welches mit Äther kristallisierte und im Papierchromatogramm keinen Fleck zeigte, wurde 2mal aus Äthanol-Äther-Petroläther umgelöst. Ausbeute: 0,11 g (54% d. Th.) Nadeln. Schmp.: 162 bis 164°.

$C_{20}H_{27}O_5N_3$ . Ber. C 61,68, H 6,98,  $OC_2H_5$  11,57. Gef. C 61,41, H 6,58,  $OC_2H_5$  11,58.

*5-Isobutyl-hydantoin-3-essigsäure* (XV) durch Hydrolyse von XIV. 0,038 g XIV wurden durch 3 Stdn. der Hydrolyse mit HCl (1 : 1) unterworfen. Die Aufarbeitung erfolgte durch Eindampfen i. Vak., Aufnehmen in Wasser und Extraktion der wäßr. Lösung. Die Ätherlösung enthielt 0,015 g (71% d. Th.) an Hydantoin XV, das nach einmaligem Umlösen aus Wasser den Schmp. von 184 bis 186° zeigte und keine Depression im Mischschmp. mit XV gab.

*Veresterung von XII mit Diazoäthan*. 0,050 g XII, gelöst in 2 ml absol. Äthanol, versetzten wir mit einer ätherischen Lösung von Diazoäthan bis zur bleibenden Gelbfärbung. Nach 3 Stdn. wurde i. Vak. zur Trockene gedampft und der Rückstand aus Äthanol-Äther umgelöst. Ausbeute: 0,032 g (64% d. Th.). Schmp.: 159 bis 162°. Mischschmp. mit XIV: 159 bis 163°.

$C_{20}H_{27}O_5N_3$ . Ber.  $OC_2H_5$  11,57. Gef.  $OC_2H_5$  11,85.

Ber. für den Diäthylester von XII  $C_{22}H_{33}O_6N_3$   $OC_2H_5$  20,70.

*Versuche zur Darstellung des Hydantoinpeptides XIII.*

a) mit HCl-Gas in Nitromethan. 0,050 g XII suspendierten wir in 5 ml Nitromethan und sättigten mit HCl-Gas, wobei Lösung eintrat. Nach 15 Min. Erwärmen auf 40° wurde i. Vak. zur Trockene gebracht, in Wasser aufge-

nommen und mit Äther extrahiert. Ausbeute: 0,045 g. Schmp.: 180 bis 181°, keine Depression mit Ausgangsmaterial.

$C_{18}H_{25}O_6N_3$ . Ber. C 56,98, H 6,64. Gef. C 56,57, H 6,64.

b) durch Erhitzen mit 0,3 n HCl. 0,050 g XII wurden mit 3 ml 0,3 n HCl  $\frac{1}{2}$  Std. zum Sieden erhitzt. Da nach dem Abdampfen i. Vak. nur ölige Substanz resultierte, wurde in Wasser gelöst und mit Äther extrahiert. Dabei schieden sich aus dem Äther 0,020 g Kristalle ab. Schmp.: 146 bis 150° (Sintern ab 138°).

In der wäßr. Phase war papierchromatographisch Phenylalanin nachzuweisen.

Gef. C 58,30, H 6,88. Ber. für Hydantoinpeptid XIII  $C_{18}H_{23}O_5N_3$  C 59,82, H 6,41. Ber. für Ausgangsmaterial XII C 56,98, H 6,64.

*Mikroabbau von Leucyl-glycyl-phenylalanin.* 0,040 g Carbäthoxy-tripeptid (0,0001 Mol) haben wir mit 0,4 ml 0,5 n NaOH 2 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt, anschließend mit 0,5 n HCl neutralisiert und i. Vak. zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde mit 3 ml HCl (1:1) 2 Stdn. zum Sieden erhitzt, i. Vak. abgedampft, in Wasser aufgenommen und 24 Stdn. mit Äther extrahiert. Die wäßr. Lösung enthielt papierchromatographisch reines Phenylalanin. Der Abdampfrückstand der Ätherschicht wurde mit 1 ml konz. HCl 5 Stdn. im Röhrchen bei 130 bis 140° behandelt, i. Vak. abgedampft, mit Tierkohle gereinigt und papierchromatographiert: Glycin und Leucin, frei von Phenylalanin.

#### c) *L-Tyrosyl-glycyl-glycin.*

*Carbonyl-(tyrosin)-(glycyl-glycin).* 0,9 g N-Cbzo-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester, dargestellt nach *Bergmann* und *Fruton*<sup>20</sup> und gereinigt durch 2maliges Umlösen aus Äthanol-Äther (Schmp.: 162 bis 163°) wurden in 6,2 ml 1 n NaOH (3 Mol) gelöst, 3 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt, hierauf mit n HCl genau neutralisiert und i. Vak. zur Trockene gebracht. Zur Entfernung von Kochsalz wurde mit absol. Äthanol ausgekocht. Es hinterblieben 0,6 g (89% d. Th.) pulveriger Rückstand, der keine Cl- und Ninhydrinreaktion mehr zeigte. Er war leicht löslich in Wasser und Alkohol, ließ sich nicht umlösen und zerfloß allmählich von 60 bis 100°.

$C_{14}H_{17}O_7N_3$ . Ber. Äqu.-G. 169,6. Gef. Äqu.-G. 191.

*5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure (XVIII).* 0,150 g Tyr-CO-Gly-Gly erhitzten wir mit 10 ml HCl (1:1)  $2\frac{1}{2}$  Stdn. zum Sieden. Die Aufarbeitung erfolgte, wie schon mehrfach beschrieben, durch Ätherextraktion. Während die wäßr. Schicht papierchromatographisch fast reines Glycin enthielt, lieferte die Ätherschicht 0,080 g (67% d. Th.) Hydantoin. Prismen aus Wasser. Schmp.: 218 bis 221° (geringe Zers.). Die Literatur<sup>21</sup> gibt als Schmp. 217 bis 218° an.

$C_{12}H_{12}O_5N_2$ . Ber. C 54,55, H 4,58. Gef. C 54,11, H 4,77.

Zur weiteren Charakterisierung wurde der Äthylester durch Behandeln mit äthanol. HCl in der Hitze dargestellt. Aus Äthanol Nadeln. Schmp.: 195 bis 196° (Literaturschmp.<sup>21</sup> 195°).

*Behandlung von Tyr-CO-Gly-Gly mit äthanol. HCl durch 15 Min.* Beim Behandeln von 0,2 g der Carbonylverbindung mit äthanol. HCl in der Wärme durch 15 Min. resultierten nach dem Behandeln des Abdampfrück-

standes mit Äthanol-Äther-Petroläther 0,12 g kristallisiertes Rohprodukt. Durch Umlösen aus Äthanol-Äther ließ sich daraus eine geringe Menge vom Schmp. 195 bis 196° isolieren, die mit dem Äthylester von XVIII im Mischschmp. keine Depression gab. Aus der Mutterlauge kristallisierte beim Zusatz von mehr Äther eine Verb. von Schmp.: 79 bis 85°. (Keine Depression mit dem Diäthylester von Tyr-CO-Gly-Gly.)

Im Rohprodukt waren papierchromatographisch beträchtliche Mengen von Glycin-äthylester nachzuweisen.

*Diäthylester von Tyr-CO-Gly-Gly.* Wurden 0,14 g Carbonylverbindung nur 5 Min. in der Wärme mit äthanol. HCl behandelt, so erhielten wir 0,09 g Diäthylester (56% d. Th.).

Aus Äthanol-Äther schuppige Blättchen. Schmp.: 83 bis 86°. Schwach hygroskopisch.

$C_{18}H_{25}O_7N_3$ . Ber.  $OC_2H_5$  22,78, N 10,61. Gef.  $OC_2H_5$  23,13, N 10,17.

Aus diesem Diäthylester konnte durch 2stünd. Erhitzen mit HCl (1:1) das Hydantoin XVIII in einer Ausbeute von 70% d. Th. gewonnen werden.

d) *L-Tyrosyl-glycyl-DL-phenylalanin.*

*Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester.* Durch 2maliges Verestern von 5,5 g Glycyl-DL-phenylalanin<sup>17</sup> in der Kälte mit je 70 ml äthanol. HCl erhielten wir 5,5 g (77% d. Th.) an Esterchlorhydrat. Aus Äthanol-Äther Blättchen. Schmp.: 167 bis 170° (Zers.).

$C_{13}H_{18}O_3N_2 \cdot HCl$ . Ber. Cl 12,37. Gef. Cl 12,45.

Aus 5 g Esterchlorhydrat setzten wir den Ester mit Kaliumkarbonat unter Chloroform in üblicher Weise in Freiheit. Ausbeute: 3,8 g (88% d. Th.). Der Ester stellt ein schwach gelbes zähes Öl dar.

*N-Cbzo-L-tyrosyl-glycyl-DL-phenylalanin-äthylester.* 0,85 g N-Cbzo-L-tyrosin-hydrazid wurden in einer Mischung von 15 ml Wasser und 3,5 ml konz. HCl gelöst, auf -3° gekühlt und unter Rühren mit einer Lösung von 0,2 g  $NaNO_2$  (1 Mol) in 2 ml Wasser diazotiert. Dabei schied sich sofort das Azid ab. Nach Aufnehmen desselben in 20 ml eisgekühltem Essigester haben wir mit Wasser,  $NaHCO_2$ -Lösung und wieder mit Wasser (alle Lösungen eiskalt) durchgeschüttelt, kurz über Natriumsulfat getrocknet und mit einer Lösung von 0,65 g Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester (1 Mol) in 20 ml Essigester versetzt. Nach 24stünd. Stehen bei 0° wurde nacheinander mit n-HCl,  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser durchgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und der Essigester i. Vak. verdampft. Es hinterblieben 1,1 g (82% d. Th.) eines schwach gelblichen Glases. Dieses ließ sich in gut getrocknetem Zustand zwar pulvern, aber nicht zur Kristallisation bringen.

$C_{30}H_{33}O_7N_3$ . Ber.  $OC_2H_5$  8,23. Gef.  $OC_2H_5$  8,25.

*Carbonyl-(tyrosin)-(glycyl-DL-phenylalanin).* 1,0 g obigen Cbzo-tripeptidesters haben wir mit 6,0 ml (3,1 Mol) 1 n NaOH, wie schon öfter beschrieben, in Tyr-CO-Gly-Phe übergeführt. Da das Rohprodukt in diesem Fall schwache Ninhydrinreaktion zeigte, wurde es in Essigester gelöst und mit verd. HCl und Wasser durchgeschüttelt. Ausbeute: 0,5 g (64% d. Th.)

Auch dieses Produkt ließ sich nicht zur Kristallisation bringen.

$C_{21}H_{23}O_7N_3$ . Ber. Äqu.-G. 214,7. Gef. Äqu.-G. 231.

*5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure (XVIII).* Aus 0,1 g Tyr-CO-Gly-Phe konnten wir durch Behandlung mit HCl (1:1) — wie schon öfter

beschrieben — 0,043 g (70% d. Th.) Hydantoin erhalten. Dieses zeigte nach einmaligem Umlösen aus Wasser den Schmp.: 217 bis 220° und gab keine Depression im Mischschmp. mit dem aus Tyr-CO-Gly-Gly erhaltenen Produkt. In der nach der Ätherextraktion verbliebenen wäbr. Lösung war papierchromatographisch reines Phenylalanin enthalten.

*Veresterung von Tyr-CO-Gly-Phe mit äthanol. HCl.* Behandlung von 0,2 g mit äthanol. HCl durch 15 Min. in der Hitze und normale Aufarbeitung ergaben 0,2 g eines zähen Öls, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Zur Reinigung wurde es in Chloroform gelöst und mit 1 n HCl und NaHCO<sub>2</sub>-Lösung durchgeschüttelt.

Gef. OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 14,52. Ber. für Hydantoinpeptidester C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 10,25, für Diäthylester C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> 18,56.

e) *DL-Alanyl-glycyl-DL-phenylalanin.*

*N-Carbomethoxy-DL-alanyl-glycyl-DL-phenylalanin-äthylester.* Durch Kuppeln von 0,38 g Glycyl-DL-phenylalanin-äthylester mit dem Azid aus 0,25 g N-Carbomethoxy-DL-alanin-hydrazid<sup>24</sup> in ätherischer Lösung erhielten wir nach üblicher Aufarbeitung 0,14 g (25% d. Th.) eines zähen Öls, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Zur Reinigung wurde es in Essigester gelöst, mit HCl, Bikarbonat und Wasser durchgeschüttelt. Es zeigte keine Ninhydrinreaktion und lieferte nach Hydrolyse mit konz. HCl im Papierchromatogramm Alanin, Glycin und Phenylalanin.

*Abbau des Carbomethoxy-tripeptidesters.* Dieser Abbau wurde, wie beim Mikroabbau des Leucyl-glycyl-phenylalanins beschrieben, ohne Isolierung der Zwischenstufen ausgeführt. Es erwies sich aber hier notwendig, die Carbonyl-bisaminoverbindung Ala-CO-Gly-Phe durch Lösen in Essigester und Ausschütteln mit HCl zu reinigen. Die wäbr. Phase der Ätherextraktion des Hydrolysates zeigte im Papierchromatogramm Phenylalanin, das in geringem Maße mit Glycin und Alanin verunreinigt war, während das aus der Ätherschicht gewonnene Hydantoin nach Druckhydrolyse mit konz. HCl im Rohr durch 5 Stdn. bei 140° ausschließlich Glycin und Alanin ohne Spuren Phenylalanin lieferte.

Bestimmung der Aminosäure im Leucyl-glycyl-phenylalanin.

Zu diesem Zweck wurden 0,080 g Carbonyl-(leucin)-(glycyl-phenylalanin) XII mit 2 ml SOCl<sub>2</sub> 20 Min. bei 30 bis 40°, dann noch 10 Min. bei 60° behandelt. Nach dem Abdampfen des überschüssigen SOCl<sub>2</sub> i. Vak. und Trocknen des Rückstandes über KOH im Exsiccator wurde in 8 ml absol. Dioxan gelöst, mit 0,1 g NaBH<sub>4</sub> versetzt und 1 Std. am siedenden Wasserbad erhitzt. Den Abdampfückstand zersetzten wir mit Wasser, alkalisierten mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und extrahierten 24 Stdn. im Apparat mit Äther. Der Ätherrückstand — 0,05 g gelbrote, glasige Substanz — wurde nun mit konz. HCl 7 Stdn. bei 140 bis 150° hydrolysiert, zur Trockene gedampft, in Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 8 gebracht und erneut extrahiert. Die wäbr. Phase wurde angesäuert (HCl), zur Trockene gedampft, der Rückstand mit absol. Äthanol ausgekocht und die äthanol. Lösung nach dem Eindampfen papierchromatographiert. Es waren nur Leucin und Glycin ohne Spuren Phenylalanin vorhanden.

<sup>24</sup> K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. 82, 799 (1951).

*Behandlung von Carbonyl-bisglycin (III) mit  $\text{SOCl}_2$ .* 0,2 g III haben wir mit 2 ml  $\text{SOCl}_2$  bis zur Lösung (2 Stdn.) am Wasserbad behandelt und den Abdampfückstand mit 5 ml absol. Äthanol versetzt (24 Stdn. bei Zimmer-temp.). Durch Behandeln des Rückstandes mit Äthanol-Äther konnte eine Fraktion (Schmp.: 145 bis 147°, 0,03 g) gewonnen werden, die mit dem Di-äthylester von III identisch war, während eine tiefer schmelzende (Schmp.: 118 bis 120°, 0,10 g) sich als Hydantoin-3-essigsäure-äthylester erwies.

Die Mikro-C-, H- und N-Analysen sowie die Halogenbestimmung wurden von Herrn Dr. G. Kainz im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Institutes durchgeführt.

### Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode mitgeteilt, die es gestattet, die am Aminoende eines Peptides befindliche *Aminosäure* und die ihr benachbarte in einem Arbeitsgang zu bestimmen.

Das Verfahren wurde an fünf Tripeptiden erprobt, wo es in allen Fällen eindeutige Ergebnisse — auch im Mikromaßstab — lieferte.

2. Gleichzeitig damit wurde ein Verfahren zur Bestimmung der *Aminosäure* im gleichen Arbeitsgang bei einfachen Peptiden (demonstriert am Leucyl-glycyl-phenylalanin) entwickelt.

3. Mit diesem Abbau zusammenhängende Fragen bezüglich der Struktur der dabei auftretenden Hydantoine werden diskutiert und eine Möglichkeit angegeben, die Struktur eines aus zwei verschiedenen Aminosäuren aufgebauten Hydantoin zu bestimmen.