

Konstitutionsermittlung von Peptiden.

II. Die Bestimmung der *Aminosäure*², der ihr benachbarten und der *Aminosäure*² in Tri- und Tetrapeptiden.

VI. Mitteilung über Peptide¹.

Von

F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 10. Sept. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

In der vorigen Mitteilung¹ konnten wir zeigen, daß die Alkalibehandlung von Carbalkoxy-tripeptiden zu Carbonyl-aminosäurepeptiden I führt, die bei anschließender Säurehydrolyse die *Aminosäure*² und die ihr benachbarte als Hydantoin abspalten. Es wurde auch in einem Falle die Bestimmung der *Aminosäure*² beschrieben, die durch Natriumborhydridreduktion des mit SOCl_2 behandelten Carbonyl-aminosäurepeptides I erfolgte. Dabei wird die *Aminosäure* zum Alkohol reduziert und fehlt dann im Papierchromatogramm des hydrolysierten Produktes, nachdem der Aminoalkohol durch Extraktion entfernt wurde.

Wir haben nun in Fortführung dieser Arbeiten die Methode zur Bestimmung der *Aminosäure* und der ihr benachbarten an einigen weiteren Tripeptiden sowie an einem Tetrapeptid studiert und konnten zeigen, daß die Methode in allen Fällen, auch dort, wo die Bedingungen für die Abspaltung des Hydantoins — wie in der vorigen Mitteilung ausführlicher diskutiert — ungünstig liegen, brauchbare und eindeutige Resultate liefert. Ebenso haben wir das Verfahren zur Bestimmung der *Aminosäure* an weiteren Beispielen — bis zum Tetrapeptid — erprobt. Zuletzt

¹ V. Mitteilung: F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. **83**, 1156 (1952); siehe auch Nature (London) **169**, 708 (1952).

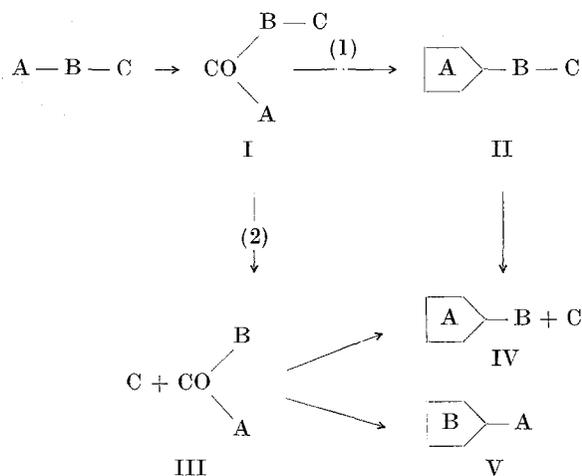
² Nach einem Vorschlag von S. W. Fox, Adv. Prot. Chem. **2**, 155 (1945), wollen wir die *Aminosäure*, die die freie Aminogruppe eines Peptides trägt, als *Aminosäure*, die am Carboxylende befindliche als *Aminosäure* bezeichnen.

wurde die Möglichkeit der Umlagerung isomerer Hydantoine ineinander näher untersucht. Hierüber soll im folgenden berichtet werden.

Wie in der vorigen Mitteilung näher erörtert, kann die Bildung des Hydantoins bei der Säurebehandlung eines aus dem Peptid A—B—C entstandenen Carbonyl-*aminosäure*-peptides I im wesentlichen auf 2 Wegen erfolgen:

1. kann I primär Ringschluß zum Hydantoinpeptid³ II erleiden, was besonders dann der Fall sein wird, wenn der Rest der Aminosäure A groß gegen den von B ist (der Ringschluß von Hydantoinen erfolgt um so leichter, je größer der Rest am C-Atom 5 ist⁴), und

2. kann zuerst Spaltung der Peptidbindung B—C von I erfolgen, wobei der Ringschluß der entstehenden Carbonyl-bisaminosäure III zum Hydantoin wieder im wesentlichen von der Größe der Reste von A und B gesteuert werden wird. Prinzipiell können also die beiden möglichen Hydantoine IV und V nebeneinander entstehen.



(Über die vereinfachte Darstellung der Hydantoine vgl. vorige Mitteilung¹.)

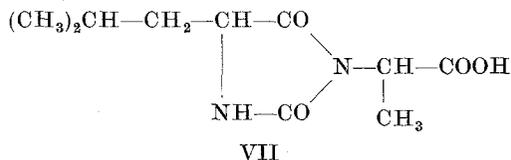
Die in der vorigen Mitteilung beschriebenen 5 Peptide, bei denen in 4 Fällen der Rest von A größer als der von B war (in einem Falle gleich), lieferten durchwegs Hydantoine der Formel IV, bei denen die *Aminosäure* in den Hydantoinring eingebaut ist.

In vorliegender Arbeit haben wir nun 3 Tripeptide (Gly-Tyr-Gly, Ala-Leu-Gly und Gly-Ala-Gly) untersucht, bei denen also die „schwere“ Aminosäure in der Mitte steht und bei denen ein primärer Ringschluß zum Hydantoinpeptid II nicht begünstigt erscheint. Auch hier lieferte die neue Methode eindeutige Ergebnisse, nur besaßen die Hydantoine, soweit sie isoliert werden konnten, die stabilere Struktur (in diesen Fällen V), so daß für die Bildung dieser Produkte Möglichkeit 2 obigen

³ K. Schlögl, F. Wessely und G. Korger, Mh. Chem. 83, 493 (1952).

⁴ E. Ware, Chem. Reviews 46, 403 (1950).

Der Abbau des 2. Tripeptides, des DL-Alanyl-DL-leucyl-glycins, dargestellt nach *E. Fischer*⁷, verlief prinzipiell analog. Das gut kristallisierte Carboäthoxy-peptid haben wir mit Lauge umgelagert und das Carbonyl-aminosäure-peptid Ala-CO-Leu-Gly mit Äther extrahiert. Es war nur amorph, zeigte bei der Äquivalentsgewichtsbestimmung etwas zu hohe Werte, konnte jedoch beim vorsichtigen Verestern mit äthanol. HCl in den kristallisierten Diäthylester übergeführt werden. Dieser sowohl, wie die freie Dicarbonsäure gab beim Erhitzen mit HCl ein rohes Hydantoin, das nach Druckhydrolyse im Papierchromatogramm nur Alanin und Leucin zeigte, während das in der wäßrigen Lösung enthaltene Glycin mit wenig Leucin und Alanin verunreinigt war, deren Menge um so mehr zunahm, je länger das Ala-CO-Leu-Gly mit HCl erhitzt worden war. Aus dem rohen Hydantoin, das glasig anfiel, konnte beim Behandeln mit Wasser wenig einer kristallisierten Verbindung erhalten werden, die nach den Analysenwerten und nach Konstitutionsermittlung mit Natriumborhydrid (siehe vorige Mitteilung) als 5-Isobutylhydantoin-3- α -propionsäure VII anzusprechen ist. Der nicht kristallisierende Rückstand lieferte beim Abbau ein Gemisch von Alanin und



Leucin und scheint somit ein Gemisch der beiden isomeren Hydantoinen darzustellen. Die Verhältnisse werden hier noch durch die beiden asymmetrischen C-Atome kompliziert.

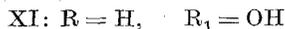
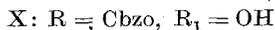
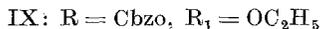
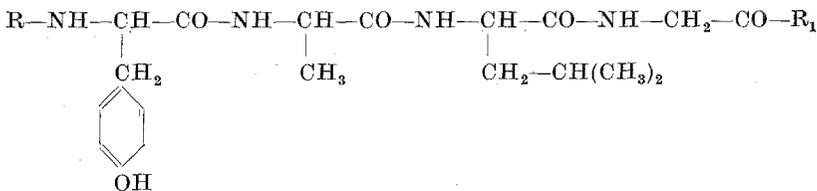
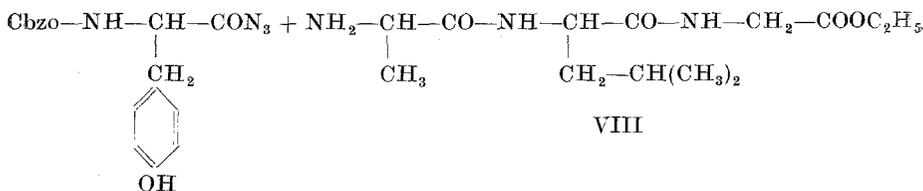
Das letzte Tripeptid Glycyl-DL-alanyl-glycin⁸ bauten wir wieder im Halbmikromaßstab ab, wobei wir von 0,1 g Carboäthoxy-peptid ausgingen und wie üblich verfahren.

Zur Darstellung des bisher nicht beschriebenen Tetrapeptides L-Tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin XI wurde der Äthylester VIII des erwähnten Tripeptides Ala-Leu-Gly mit N-Cbzo-L-tyrosinazid gekuppelt, wobei in guten Ausbeuten der N-Cbzo-tetrapeptid-äthylester IX erhalten wurde. Dieser konnte zum N-Cbzo-tetrapeptid X verseift werden, aus dem wir durch Abhydrierung der N-Cbzo-gruppe in üblicher Weise wenig des freien Tetrapeptides XI erhalten konnten.

Zum Abbau verwendeten wir den Cbzo-tetrapeptidester IX. Als Hydantoin war hier die 5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3- α -propionsäure

⁷ Liebigs Ann. Chem. **340**, 123 (1905).

⁸ Für die Überlassung von Peptiden sind wir Herrn Dir. Dr. *F. Mietzsch*, Bayerwerke Elberfeld, und der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, zu großem Dank verpflichtet.



zu erwarten, die in der Literatur bereits beschrieben ist⁹. Sie besitzt aber infolge der beiden Asymmetriezentren ein Schmelzpunktsintervall von 168 bis 190°, ist überdies in Wasser und Äthanol so leicht löslich, daß wir sie infolge der uns zur Verfügung stehenden geringen Menge nicht kristallin erhalten konnten. Nach Hydrolyse war aber im Papierchromatogramm nur Alanin und Tyrosin zu finden, während nach Abbau mit NaBH₄ nur Tyrosin zu finden war, ein Beweis für die angenommene Struktur.

Die nach Extraktion des Hydantoins verbleibende wäßrige Lösung enthielt im Papierchromatogramm Leucin und Glycin, das noch mit Spuren Tyrosin und Alanin verunreinigt war. Es war also gelungen, die Struktur des Tetrapeptides insofern zu bestimmen, als die beiden Hälften des Moleküls (Tyrosin und Alanin einerseits, Leucin und Glycin andererseits) bekannt waren. Zusammen mit der noch zu besprechenden Bestimmung der Aminosäure, die die Reihenfolge Leucin-Glycin festlegte, waren die Möglichkeiten für die Konstitution des Tetrapeptides auf 2 (Tyr-Ala-Leu-Gly oder Ala-Tyr-Leu-Gly) eingeschränkt, während sich aus der durch Hydrolyse und Papierchromatographie erhaltenen Kenntnis der 4 am Aufbau beteiligten Monoamino-monocarbonsäuren — für den Fall eines unbekanntes Peptides — 24 Möglichkeiten ergeben hätten.

Die in der vorigen Mitteilung¹ kurz erwähnte Möglichkeit zur Bestimmung der Aminosäure — beschrieben für den Fall des Leu-Gly-Phe —

⁹ D. A. Hahn und E. Gilman, J. Amer. chem. Soc. 47, 2941 (1925).

haben wir näher untersucht und in den geprüften Fällen als anwendbar gefunden.

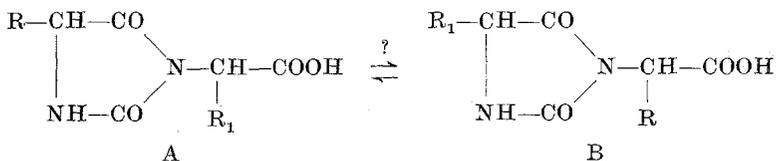
Die Bestimmung der *Aminosäure* beruht auf der Reduktion des Säurechlorides des bei der Umlagerung erhaltenen Carbonyl-*aminosäure*-peptides I bzw. des N-Carbalkoxy-peptides mit NaBH_4 . Im Papierchromatogramm fehlt dann nach Hydrolyse und Entfernung des gebildeten Aminoalkohols die *Aminosäure*, die die freie Carboxylgruppe des Peptides trug. Kurze Behandlung der angeführten Verbindungen mit SOCl_2 (10 bis 12 Min. bei 40 bis 50°) führt zu rotgefärbten Produkten, die nicht gereinigt und näher untersucht, sondern direkt der Reduktion mit NaBH_4 unterworfen wurden.

Die Carbonyl-*aminosäure*-peptide scheinen in allen Fällen mit SOCl_2 zu den Hydantoinpeptiden ringzuschließen, da immer nur die *Aminosäure*, nicht aber auch die *Aminosäure* im Papierchromatogramm fehlte. Näheres darüber wurde bereits in der vorigen Mitteilung ausgeführt.

Wir haben mit dieser Methode die *Aminosäure* in folgenden Peptiden bestimmt und eindeutige Resultate erhalten: Alanyl-glycin⁸ (als N-Carboäthoxy-Ala-Gly), Alanyl-leucyl-glycin (als N-Carboäthoxy-Ala-Leu-Gly und Ala-CO-Leu-Gly) und Tyrosyl-alanyl-leucyl-glycin (als Tyr-CO-Ala-Leu-Gly). In allen diesen Fällen fehlte die *Aminosäure* im Papierchromatogramm völlig oder war nur in solchen Spuren vorhanden, daß eine eindeutige Entscheidung ohne weiteres möglich war.

Zusammen mit der Methode zur Bestimmung der *Aminosäure* und der ihr benachbarten sind wir also imstande, bei Tri- und Tetrapeptiden einfacheren Baues die Möglichkeiten, die sich aus der Kenntnis der am Bau beteiligten Aminosäuren ergeben, von 6 bzw. 24 auf 2 einzuschränken. (Für den Fall, daß die Peptide aus 3 bzw. 4 verschiedenen Monoaminomonocarbonsäuren aufgebaut sind.) Bei Tripeptiden wird in den meisten Fällen ja schon die Bestimmung der *Aminosäure* und der ihr benachbarten genügen, woraus sich die Kenntnis der *Aminosäure* leicht ergibt, obwohl zur Bestätigung dieser Ergebnisse die Bestimmung der *Aminosäure* gute Dienste leistet, während sie bei Dipeptiden allein erlaubt, die Konstitution des Peptides zu ermitteln. Bei Tetrapeptiden wird, wie schon erwähnt, die Reihenfolge der Aminosäuren 3 und 4 festgelegt, deren Kenntnis aus der Hydrolyse des Hydantoin, das aus Aminosäure I und 2 aufgebaut ist, hervorgeht.

Im Zusammenhang mit der Frage der Abspaltung des Hydantoin aus dem Carbonyl-*aminosäure*-peptid war das Problem einer eventuellen Umlagerung eines Hydantoin A in das Hydantoin B (wenn der Rest R_1 größer als R ist) durch Erhitzen mit Säuren aufgetaucht. Da diese Frage auch von allgemeinerer Bedeutung in bezug auf die Stabilität des Hydantoinringes schien, haben wir uns etwas näher damit befaßt. Daß die bei der alkalischen Aufspaltung erhältlichen Carbonyl-

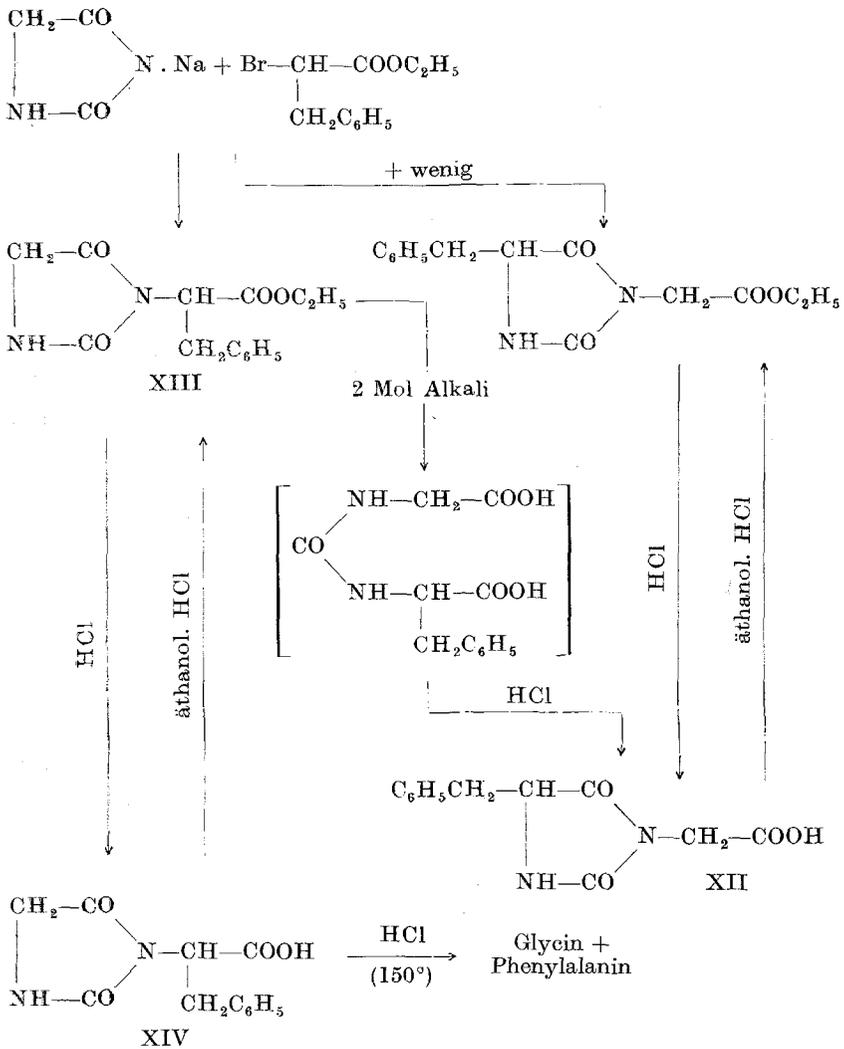


bisaminosäuren bei Säurebehandlung nur in der Richtung der bevorzugteren Struktur ringschließen, war schon bekannt⁴.

Zur Klärung dieser Frage schien uns das Paar der isomeren Hydantoine, die aus Glycin und Phenylalanin aufgebaut sind (XII und XIV), geeignet, da infolge der großen Unterschiede der Reste ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ bzw. H) die Effekte besonders deutlich sein mußten. Zu diesem Zwecke haben wir den bisher nicht beschriebenen Hydantoin-3- β -phenyl- α -propionsäure-äthylester XIII durch 2tägiges Erhitzen von Hydantoin-Na mit β -Phenyl- α -brom-propionsäure-äthylester dargestellt. Neben einem Teil nicht umgesetzten Brom-esters konnte auch eine beträchtliche Menge Zimtsäureester nachgewiesen werden. Außerdem wurde neben dem gewünschten Produkt XIII auch wenig des isomeren 5-Benzyl-hydantoin-3-essigesters isoliert und durch Analyse, Schmp. und Mischschmp. identifiziert. Dieser war wahrscheinlich durch Aufspaltung des primär gebildeten Hydantoins XIII durch etwas überschüssiges Alkali und Ringschluß bei der anschließenden Destillation zum stabileren Produkt oder eventuell durch Substitution eines H-Atoms am C-Atom 5 entstanden. Der Ester XIII ließ sich erst nach mehrstündigem Erhitzen mit HCl zur freien Säure XIV verseifen, die in mäßigen Ausbeuten erhalten, nach öfterem Umlösen den Schmp. 190 bis 193° zeigte und mit 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure eine starke Depression gab, während Verseifung mit 1 Mol Alkali unbefriedigend verlief. Die Konstitution von XIV wurde wie folgt bewiesen:

1. Druckhydrolyse mit HCl gab Glycin und Phenylalanin.
2. Abbau mit NaBH_4 zeigte im Papierchromatogramm nur Glycin neben ganz wenig Phenylalanin.
3. Verestern der freien Säure XIV führte wieder zum Ester XIII und
4. Erhitzen des Esters XIII mit 2 Mol Alkali (Ringaufspaltung!) und anschließendes Behandeln mit HCl in der Hitze lieferte 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure.

Als wir nun XIV durch 3 Stdn. mit HCl (1:1) erhitzen (das sind die Bedingungen, denen die Hydantoine beim Peptidabbau im allgemeinen ausgesetzt werden), zeigte sich, daß der Schmp., der vorher 190 bis 193° betragen hatte, sich nur unwesentlich änderte (189 bis 193°), während XIV mit zirka gleichen Mengen XII einen Mischschmp. von 156 bis 165° gibt. Es war also eine Umlagerung, wenn überhaupt, nur in untergeordnetem Maß eingetreten.



Experimenteller Teil.

a) Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten.

1. Im Glycyl-L-tyrosyl-glycin.

Carbonyl-(glycin)-(tyrosyl-glycin). 0,91 g N-Cbzo-glycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester⁵ wurden mit 6 ml 1 n NaOH (3 Mol) 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. am Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde mit 6 ml 1 n HCl neutralisiert und mit Äther im Apparat erschöpfend extrahiert. Der Ätherrückstand wog 0,6 g (87% d. Th.). Gelbliches, amorphes Pulver, leicht wasserlöslich.

5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure (VI). 0,6 g Gly-CO-Tyr-Gly wurden mit 15 ml HCl (1:1) 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. zum Sieden erhitzt, im Vak. abge-

dampft, in wenig Wasser aufgenommen und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt (0,4 g = 86% d. Th.) wurde 2mal aus Wasser umgelöst und schmolz von 221 bis 224°¹⁰. Mischschmp. mit dem in der vorigen Mitteilung¹ beschriebenen Produkt: 221 bis 224°. Ein Teil wurde mit konz. HCl 6 Stdn. bei 150° hydrolysiert und gab im Papierchromatogramm Glycin und Tyrosin.

5-(*p*-Oxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure-äthylester. 0,2 g VI lösten wir in 10 ml absol. Äthanol, sättigten mit HCl-Gas und erhitzen noch 30 Min. zum Sieden. Der Abdampfrückstand, 1mal aus Äthanol umgelöst (Nadeln), schmolz von 195 bis 197° und gab keine Depression im Mischschmp. mit einer authentischen Probe.

2. Im DL-Alanyl-DL-leucyl-glycin.

N-Carboäthoxy-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin. 2 g Tripeptid⁷, in 8 ml 1 n NaOH (1 Mol) gelöst, wurden bei 0° mit 1,0 g (1,2 Mol) Äthylchlorkohlensäureester und verd. Sodalösung in üblicher Weise acyliert. Nach dem Ansäuern mit konz. HCl auf pH 3 fiel nach einigem Stehen auf Eis ein dichter Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurde. Ausbeute 1,95 g (76% d. Th.). Aus Wasser Blättchen. Schmp. 179 bis 181°. C₁₄H₂₅O₆N₃. Ber. N 12,69, Äqu.-Gew. 331. Gef. N 13,03, Äqu.-Gew. 332 (titr.).

Carbonyl-(alanin)-(leucyl-glycin). 0,66 g Carboäthoxy-tripeptid wurden mit 8 ml 0,5 n NaOH (2 Mol) durch 2stünd. Erhitzen in das Carbonyl-aminosäure-peptid umgelagert und dieses nach Neutralisation mit 4 ml 1 n HCl der Lösung durch Ätherextraktion entzogen. Ausbeute 0,56 g (92% d. Th.) amorphes Pulver.

C₁₂H₂₁O₆N₃. Ber. Äqu.-Gew. 151,6. Gef. Äqu.-Gew. 174.

Diäthylester des Carbonyl-aminosäure-peptides Ala-CO-Leu-Gly. 0,1 g obigen Produktes haben wir 10 Min. mit gesättigter äthanol. HCl erhitzt. Der Abdampfrückstand kristallisierte auf Ätherzusatz und wurde aus wenig Äthanol-Äther-Petroläther umgelöst. Stäbchen. Schmp. 154 bis 157°.

C₁₆H₂₉O₆N₃. Ber. C 53,46, H 8,13, OC₂H₅ 25,08.
Gef. C 53,60, H 8,40, OC₂H₅ 25,09.

5-Isobutyl-hydantoin-3- α -propionsäure (VII). 0,25 g Ala-CO-Leu-Gly haben wir 2 Stdn. mit HCl (1 : 1) zum Sieden erhitzt und den Abdampfrückstand in Wasser aufgenommen. Dabei blieben 0,03 g (16% d. Th.) ungelöst, wurden abfiltriert und aus Wasser umgelöst. Blättchen. Schmp. 168 bis 174°.

C₁₀H₁₆O₄N₂. Ber. N 12,27. Gef. N 12,47.

Der Mutterlauge wurde das restliche Hydantoin durch Ätherextraktion entzogen; es konnte aber nicht mehr zur Kristallisation gebracht werden. Nach Hydrolyse dieses Produktes durch 5 Stdn. bei 150° mit konz. HCl war im Papierchromatogramm nur Leucin und Alanin zu finden, während die wäßr. Lösung aus dem Extraktor Glycin enthielt, das durch Leucin und Alanin verunreinigt war. Die Menge dieser beiden Aminosäuren ging jedoch stark zurück, wenn das Erhitzen des Carbonyl-aminosäure-peptides mit HCl nur 1/2 Std. durchgeführt wurde.

¹⁰ Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktapparat nach Kofler bestimmt.

Konstitutionsbeweis von VII durch Abbau mit NaBH₄.

Zirka 25 mg des kristallisierten Hydantoins VII wurden durch 1 Stünd. Erhitzen mit 1 ml SOCl₂ ins Säurechlorid übergeführt. Nach Abdampfen des SOCl₂ im Vak. wurde noch mehrere Stdn. im Exsikkator über KOH aufbewahrt, hierauf in 5 ml absol. Dioxan gelöst und mit 0,1 g NaBH₄ 2 Stdn. im sied. Wasserbad erhitzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels haben wir den Rückstand vorsichtig mit Wasser zersetzt, mit NaHCO₃ gesättigt und im Apparat mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand (Hydantoinalkohol) wurde 5 Stdn. bei 150 bis 160° mit konz. HCl hydrolysiert, der Abdampfrückstand in Wasser gelöst, mit einigen Tropfen verd. NaOH auf pH 8 gebracht und erneut mit Äther zur Entfernung des Aminoalkohols extrahiert. Endlich wurde die wäßr. Lösung mit HCl eben angesäuert, im Vak. zur Trockene gebracht, erneut in Wasser gelöst, mit Tierkohle gereinigt, und nach dem neuerlichen Eindampfen der Rückstand mit absol. Äthanol ausgekocht. Die alkohol. Lösung zeigte im Papierchromatogramm Leucin, das durch Spuren Alanin verunreinigt war.

Das nicht kristallisierte Hydantoin gab beim geschilderten Abbau ein Gemisch von Leucin und Alanin (vgl. S. 1429).

3. Im Glycyl-DL-alanyl-glycin.

N-Carboäthoxy-glycyl-DL-alanyl-glycin. 0,25 g Tripeptid⁸ wurden in üblicher Weise in die Carboäthoxyverbindung übergeführt. Da diese leicht wasserlöslich ist, mußte sie durch Eindampfen der Reaktionsmischung im Vak. und Auskochen des Rückstandes mit absol. Äthanol gewonnen werden. Sie stellte ein Glas dar, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

C₁₀H₁₇O₆N₃. Ber. Äqu.-Gew. 275. Gef. Äqu.-Gew. 280.

Der Abbau des Peptides wurde mit 0,1 g Carbäthoxyverbindung in der schon öfter beschriebenen Weise ausgeführt, wobei die vom Hydantoin durch Ätherextraktion befreite wäßr. Lösung neben viel Glycin wenig Alanin als Verunreinigung enthielt.

4. Im L-Tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin XI.

DL-Alanyl-DL-leucyl-glycyl-äthylester (VIII). 1,0 g Tripeptid⁷ suspendierten wir in 20 ml absol. Äthanol und sättigten unter Kühlung mit HCl-Gas. Anschließend wurde noch 5 Min. zum Sieden erhitzt und dann im Vak. abgedampft. Das Esterchlorhydrat hinterblieb als pulvrige, etwas hygroskopische Masse, die sich nicht umlösen ließ. Sie wurde zur Analyse 2mal mit Äthanol abgedampft und längere Zeit im Exsikkator über KOH getrocknet.

C₁₃H₂₅O₄N₃ · HCl. Ber. Cl 10,95, OC₂H₅ 13,92.
Gef. Cl 10,38, OC₂H₅ 13,61.

Aus dem Chlorhydrat wurde der Ester in üblicher Weise mit Kaliumkarbonat und Essigester in Freiheit gesetzt. Ausbeute 0,9 g (81% d. Th.) glasiges Öl. $R_F = 0,71$ (Schleicher-Schüll 2043 b, Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5).

N-Cbzo-L-tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin-äthylester (IX). 0,45 g N-Cbzo-L-tyrosin-hydrazid wurden in einer Mischung von 7 ml Wasser und 2 ml konz. HCl gelöst und unter Köhlen und Rühren mit einer Lösung von 0,10 g NaNO₂ (1 Mol) in 2 ml Wasser diazotiert. Das Azid wurde mit

15 ml eiskaltem Essigester ausgeschüttelt, die Lösung nacheinander mit Wasser, NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, kurz über Na_2SO_4 getrocknet und mit einer Lösung von 0,6 g Ester VIII (1,5 Mol) in 15 ml Essigester vereinigt. Nach 4stünd. Stehen auf Eis und 12stünd. Stehen bei Zimmertemp. haben wir mit verd. HCl , NaHCO_3 -Lösung und Wasser durchgeschüttelt und den Essigester im Vak. verdampft. Ausbeute 0,6 g (75% d. Th.). Aus Chloroform-Äther gallertig. Zerfließt von 115 bis 121°. *Millonsche* Reaktion positiv.

$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_4$. Ber. N 9,58, OC_2H_5 7,70. Gef. N 9,87, OC_2H_5 8,00.

N-Cbzo-L-tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin (X). 0,22 g IX verseifen wir mit 1,1 ml 1 n NaOH (3 Mol) $\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemp. Nach Zusatz von 1,1 ml 1 n HCl fiel ein zäher Niederschlag aus, von dem abdekantiert wurde. In wenig Äthanol gelöst, konnte die Verbindung mit Wasser ausgefällt werden und ließ sich nach dem Trocknen pulvern. Ausbeute 0,19 g (90% d. Th.). Schmp. 95 bis 105° (Zers.).

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_4$. Ber. Äqu.-Gew. 556. Gef. Äqu.-Gew. 551.

L-Tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin (XI). 0,15 g X wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 0,3 g Pd-Tierkohle (10%) mehrere Stdn. unter geringem Wasserstoffdruck geschüttelt. Die filtrierte Lösung wurde im Vak. eingedampft und der feste Rückstand aus zirka 80%igem Äthanol umgelöst. Das Peptid zersetzt sich gegen 215°. Es ist leicht löslich in Wasser, schwer in Äthanol. Die *Millonsche* Reaktion ist positiv. Im Papierchromatogramm war ein einheitlicher, schwach violetter Fleck mit einem R_F -Wert von 0,75 zu finden (Schleicher-Schüll 2043b, Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5).

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_4$. Ber. N 13,26. Gef. N 13,41.

Abbau des Cbzo-tetrapeptidesters IX. Dieser Abbau wurde mit 0,3 g IX in der bereits mehrfach beschriebenen Weise ausgeführt. Die Umlagerung erfolgte durch 2stünd. Erhitzen mit 3 Mol 0,5 n Alkali, die Abspaltung des Hydantoins aus dem Carbonylamino-säurepeptid Tyr-CO-Ala-Leu-Gly durch $\frac{1}{2}$ stünd. Kochen mit HCl (1 : 1).

Das durch Ätherextraktion gewonnene Hydantoin konnte nicht kristallin erhalten werden. Ein Teil wurde 5 Stdn. bei 150° hydrolysiert und zeigte im Papierchromatogramm ausschließlich Alanin und Tyrosin, während der Abbau mit NaBH_4 in der beim Hydantoin VII beschriebenen Weise die Konstitution einer 5-(p-Oxybenzyl)-hydantoin-3- α -propionsäure bewies. In der wäßr. Schicht waren nach Abtrennung des Hydantoins Glycin und Leucin enthalten, die durch ganz wenig Tyrosin und Spuren Alanin unreinigt waren.

b) Bestimmung der Aminosäure.

Diese Bestimmung sei für den Fall des Peptides DL-Alanyl-DL-leucyl-glycin näher beschrieben. Sie wurde in den Fällen der übrigen untersuchten Peptide (Ala-Gly, Tyr-Ala-Leu-Gly) analog ausgeführt.

Als Ausgangsmaterial kann sowohl das Carballoxy-peptid, wie das Carbonyl-aminosäure-peptid verwendet werden.

0,1 g Ala-CO-Leu-Gly wurden mit 1 ml SOCl_2 $\frac{1}{2}$ Std. auf 40 bis 50° erwärmt (beim Carboäthoxy-peptid nur 10 Min.), das SOCl_2 hierauf im Vak. abgedampft und der braunrote Rückstand 2 bis 3 Stdn. im Exsikkator über KOH getrocknet. Nun haben wir in wenig absol. Dioxan gelöst, mit

0,2 g NaBH_4 versetzt und 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Der Abdampfrückstand wurde mit Wasser zersetzt und die mit Na_2CO_3 gesättigte Lösung im Apparat mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde durch 5 Stdn. bei 150° mit konz. HCl hydrolysiert (im Falle des Carbäthoxy-peptides genügt mehrstünd. Kochen) und dieses Hydrolysat, genau wie bei der Konstitutionsbestimmung des Hydantoin VII angegeben, weiter behandelt. Die resultierende wäbr. Lösung enthielt laut Papierchromatogramm nur mehr Alanin und Leucin ohne jede Spur von Glycin.

Analog eindeutige Ergebnisse wurden bei den anderen Peptiden erhalten.

Synthese von:

Hydantoin-3- β -phenyl- α -propionsäure-äthylester (XIII). 2 g Hydantoin suspendierten wir in einer Lösung von 0,46 g Na (1 Mol) in 40 ml absol. Äthanol und erhitzen $1\frac{1}{2}$ Stdn. unter Rückfluß. Hierauf wurden 5,2 g (1 Mol) β -Phenyl- α -brom-propionsäureäthylester zugegeben und weitere 48 Stdn. erhitzt. Nachdem von wenig Niederschlag abfiltriert worden war, wurde im Vak. zur Trockene gedampft, in wenig Wasser aufgenommen und gut ausgeäthert. Der Ätherrückstand wurde im Kugelrohr zuerst bei 12 Torr und 140 bis 150° Luftbadtemp. behandelt. Dabei gingen 2 g leichtbewegliches Öl über, das sich als Gemisch von Phenyl-brompropionsäureester und Zimtsäureester (Verseifung zur Zimtsäure!) erwies.

Der noch verbleibende Rest wurde bei 0,001 Torr und 175 bis 185° destilliert. 2,1 g (38% d. Th.) erstarrendes, schwach gelbliches Öl.

Durch Umlösen aus Äthanol-Äther-Petroläther erhielt man ein Gemenge von Nadeln (0,05 g) und schweren Körnern (1,2 g), die rein mechanisch getrennt werden konnten.

Die Körner wurden 2mal aus Äthanol-Äther-Petroläther umgelöst. Schmp. 131 bis 134° . Starke Depression im Mischschmp. mit 5-Benzylhydantoin-3-essigester. Pikrinsäuretest positiv.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2$. Ber. N 10,01, OC_2H_5 16,25. Gef. N 10,24, OC_2H_5 16,51.

Die Nadeln schmolzen, 2mal aus Äthanol-Äther-Petroläther umgelöst, von 154 bis 156° und gaben keine Depression im Mischschmp. mit 5-Benzylhydantoin-3-essigester.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2$. Ber. OC_2H_5 16,25. Gef. OC_2H_5 16,62.

Hydantoin-3- β -phenyl- α -propionsäure (XIV). 0,276 g XIII (Schmp. 131 bis 134°) wurden mit 5 ml konz. HCl 8 Stdn. unter Rückfluß erhitzt und der feste Abdampfrückstand mit wenig Wasser abgesaugt. Ausbeute 0,17 g (68% d. Th.). Mehrfach aus Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Äthanol umgelöst. Stäbchen. Schmp. 190 bis 193° .

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2$. Ber. C 58,07, H 4,87, Äqu.-Gew. 248.
Gef. C 57,90, H 5,17, Äqu.-Gew. 247.

Der Konstitutionsbeweis von XIV wurde auf folgende Weise geführt:

1. Mehrstündige Hydrolyse mit konz. HCl bei 150° ergab im Papierchromatogramm Phenylalanin und Glycin.

2. Der Abbau des Säurechlorids mit NaBH_4 in der beim Hydantoin VII beschriebenen Weise gab Glycin, das nur ganz wenig Phenylalanin enthielt.

3. 5-Benzylhydantoin-3-essigsäure XII aus dem Hydantoin-ester XIII. 0,14 g XIII (Schmp. 131 bis 134°) wurden mit 2 Mol 0,5 n NaOH 1 Std. am Wasserbad erhitzt, im Vak. zur Trockene gedampft und der Rückstand mit 5 ml konz. HCl 2 Stdn. zum Sieden erhitzt. Der Trockenrückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und nach einigem Stehen auf Eis

abgesaugt. Ausbeute 0,06 g (48% d. Th.). Aus Wasser Blättchen. Schmp. 182 bis 185°. Keine Depression im Mischschmp. mit 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure, starke Depression (156 bis 167°) mit XIV.

Ein Teil der so erhaltenen 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure XII wurde mit äthanol. HCl verestert. Der erhaltene Äthylester vom Schmp. 154 bis 155° erwies sich im Mischschmp. ebenfalls mit 5-Benzyl-hydantoin-3-essigester identisch.

4. *Veresterung von XIV.* Bei normaler Veresterung von XIV mit äthanol. Salzsäure durch 20 Min. erhielten wir wieder den Hydantoin-3- β -phenyl- α -propionsäure-äthylester vom Schmp. 131 bis 134°, der keine Depression im Mischschmp. mit XIII gab.

Umlagerungsversuch an XIV mit Salzsäure (1:1). Als XIV vom Schmp. 190 bis 193° 3 Stdn. mit HCl (1:1) erhitzt worden war, betrug der Schmp. nach dem Abdampfen der überschüssigen HCl im Vak., Aufnehmen des Rückstandes in wenig eiskaltem Wasser und Absaugen 189 bis 193°.

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

Zusammenfassung.

1. Die Methode zur Bestimmung der *Aminosäure* und der ihr benachbarten als Hydantoin wurde auf 3 Tripeptide und 1 Tetrapeptid angewendet. Auch bei Tripeptiden, die eine für den Hydantoinringschluß ungünstige Struktur besitzen, liefert das Verfahren eindeutige Ergebnisse.

2. Die Bestimmung der *Aminosäure* mittels NaBH₄ wird an einigen Peptiden demonstriert. In Verbindung mit der oben erwähnten Methode lieferte sie gute Resultate bei der Konstitutionsermittlung von Tripeptiden und einem Tetrapeptid.

3. Das bisher nicht beschriebene Tetrapeptid L-Tyrosyl-DL-alanyl-DL-leucyl-glycin wurde dargestellt.

4. Die Möglichkeit der Umlagerung isomerer Hydantoine ineinander wurde untersucht.