

## Konstitutionsermittlung von Peptiden.

### V. Über eine Möglichkeit zur Unterscheidung von $\alpha$ - und $\gamma$ -Glutamylpeptiden.

#### IX. Mitteilung über Peptide<sup>1</sup>.

Von

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

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

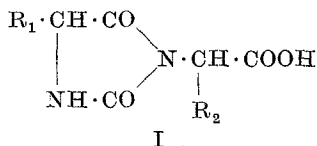
Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 8. Jan. 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 15. Jan. 1953.)

$\alpha$ -Glutamylpeptide lassen sich von  $\gamma$ -Peptiden, wie an 2 Beispielen gezeigt wird, dadurch unterscheiden, daß die Cbzo- $\alpha$ -peptide im Gegensatz zu den  $\gamma$ -Isomeren zur Bildung eines Hydantoins der allgemeinen Formel II befähigt sind.

Die Beständigkeit der Peptidbindung in den genannten Peptiden gegen Hydrolyse in wäßriger Lösung wird untersucht und der zu erwartende Unterschied qualitativ mit Hilfe der Papierchromatographie festgestellt.

Die in früheren Mitteilungen<sup>1-4</sup> angegebene Möglichkeit zur Abspaltung der aminoendständigen und der ihr folgenden Aminosäure aus Peptiden in Form von substituierten Hydantoin-3-essigsäuren I schien auch zur Unterscheidung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutamylpeptiden mit endständiger Glutaminsäure geeignet.



<sup>1</sup> VIII. Mittlg.: K. Schlögl, A. Siegel und F. Wessely, Z. physiol. Chem. 291, 265 (1952).

<sup>2</sup> F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. 83, 1156 (1952).

<sup>3</sup> F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 83, 1426 (1952).

<sup>4</sup> F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 83, 1439 (1952).

Wir haben nun diese Möglichkeit geprüft und als anwendbar gefunden, worüber im folgenden kurz berichtet werden soll.

Bisher diente zur Klärung der Frage, welche Carboxylgruppe der Glutaminsäure an der Peptidbindung beteiligt ist, im wesentlichen Oxydation des Peptides mit  $H_2O_2$ , wie sie z. B. zur Konstitutionsermittlung von Glutathion<sup>5</sup> bzw. von Glutamylglycinen<sup>6</sup> herangezogen worden war. Dabei entstehen aus  $\gamma$ -Glutamylpeptiden Succinylpeptide, während aus den  $\alpha$ -Verbindungen freie Bernsteinsäure erhalten wird.

Die Oxydation kann auch nach *Goldschmidt*<sup>6, 7</sup> mit NaOBr erfolgen und wurde in dieser Form in Kombination mit enzymatischem Abbau von *F. Haurowitz* und *F. Bursa*<sup>8</sup> zur Feststellung von  $\gamma$ -Glutamylbindungen in Proteinen verwendet.

In neuerer Zeit verwendeten *F. E. King* und *D. A. A. Kidd*<sup>9</sup> bzw. *W. J. Le Quesne* und *G. T. Young*<sup>10</sup> die Ninhydrinmethode nach *van Slyke*<sup>11</sup>, bei der freie, zur Aminogruppe  $\alpha$ -ständige Carboxylgruppen — wie sie nur in  $\gamma$ -, nicht aber in  $\alpha$ -Glutamylpeptiden vorliegen — unter Abspaltung von  $CO_2$  reagieren.

*P. Jolles* und *C. Fromageot*<sup>12</sup> reduzieren das Peptid mit  $LiAlH_4$  und erhalten nach anschließender Hydrolyse aus  $\gamma$ -Glutamylpeptiden  $\gamma$ -Amino- $\delta$ -oxy-valeriansäure, während die  $\alpha$ -Isomeren entsprechend die  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxy-valeriansäure liefern.

*J. Kovacs* und *V. Bruckner*<sup>13</sup> endlich zeigten das überwiegende Vorliegen von  $\gamma$ -Glutamylbindungen in einer nativen Poly-glutaminsäure aus *Bacillus subtilis* durch Überführung in das Poly-hydrazid, das beim *Curtius*-Abbau und anschließender Hydrolyse nur den Bernsteinsäure-halbaldehyd, nicht aber  $\alpha, \gamma$ -Diaminobuttersäure gab, die aus  $\alpha$ -Glutamylbindungen zu erwarten gewesen wäre.

Wie von uns früher gezeigt werden konnte<sup>1-3</sup>, erleiden N-Carbalkoxy-peptide bei Einwirkung von Alkali primär Ringschluß unter Bildung von Hydantoinpeptiden, die dann weiter aufgespalten werden. Für diese Bildung des Hydantoinringes ist aber eine zur Peptidbindung  $\alpha$ -ständige Aminogruppe erforderlich, wie sie in  $\alpha$ -Glutamylpeptiden vorliegt; aus diesen sind dann Hydantoine des Typs II zu erwarten. N-Carbalkoxy- $\gamma$ -glutamylpeptide dagegen müßten bei Alkoholabspaltung Verbindungen mit einem 7er Ring III geben, weshalb hier ein Ringschluß unmöglich erscheint.

<sup>5</sup> *J. H. Quastel*, *C. P. Stewart* und *H. E. Tunnicliffe*, *Biochemic. J.* **17**, 586 (1923). — *E. C. Kendall*, *B. F. McKenzie* und *H. L. Mason*, *J. Biol. Chem.* **84**, 657 (1929).

<sup>6</sup> *W. Voss* und *R. Guttmann*, *Z. physiol. Chem.* **204**, 1 (1932).

<sup>7</sup> *St. Goldschmidt*, *E. Wiberg*, *F. Nagel* und *K. Martin*, *Ann. Chem.* **456**, 1 (1927).

<sup>8</sup> *Biochemic. J.* **44**, 509 (1949).

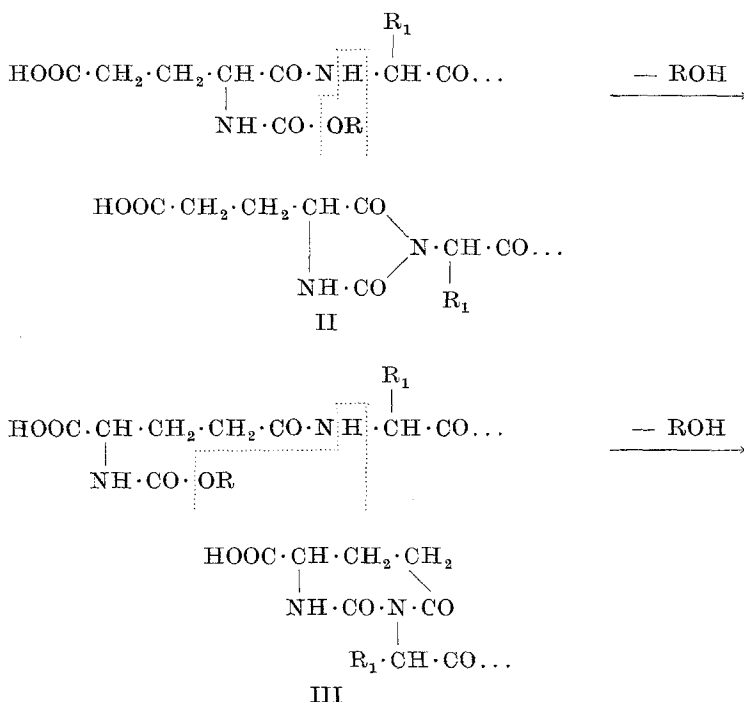
<sup>9</sup> *J. Chem. Soc. London* **1949**, 3315.

<sup>10</sup> *J. Chem. Soc. London* **1950**, **1954**, **1959**.

<sup>11</sup> *D. D. van Slyke*, *R. T. Dillon*, *D. A. MacFadyen* und *P. Hamilton*, *J. Biol. Chem.* **141**, 627 (1941).

<sup>12</sup> *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 287 (1952).

<sup>13</sup> *J. Chem. Soc. London* **1952**, 4255.



Außerdem ist, wie schon früher an den freien Peptiden festgestellt wurde<sup>6, 10, 14</sup> und wie auch wir an den Cbzo-Peptiden zeigen konnten (siehe S. 266), die  $\gamma$ -Glutamylbindung gegen Hydrolyse sehr empfindlich, so daß schon die Alkalibehandlung zur Spaltung der Peptidbindung und damit zur Abspaltung von Glutaminsäure führen wird.

Zum Beweis dieser Überlegungen wurde nun das N-Cbzo- $\alpha$ -D-Glutamylglycin (in Form des Diäthylesters) einerseits und das N-Cbzo- $\gamma$ -DL-Glutamylglycin andererseits unter völlig analogen Bedingungen dem Abbau unterworfen.

Die  $\alpha$ -Verbindung haben wir nach *J. Melville*<sup>15</sup> dargestellt und 2 Stdn. mit 0,5 n 50%iger äthanol. NaOH<sup>4</sup> umgelagert; die Carbonylbisaminosäure wurde nicht isoliert, sondern sofort 3 Stdn. mit HCl in der Hitze behandelt, um Ringschluß zum Hydantoin I ( $R_1 = HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2$ ,  $R_2 = H$ ) herbeizuführen. Dieses konnte tatsächlich in einer Ausbeute von 84% d. Th. gewonnen werden. Diesem Hydantoin konnte theoretisch auch die andere mögliche Form (I,  $R_1 = H$ ,  $R_2 = HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2$ ) zukommen, doch war dies sowohl aus Analogie

<sup>14</sup> *H. L. Mason*, *J. Biol. Chem.* **90**, 25 (1931).

<sup>15</sup> *Biochemie. J.* **29**, 179 (1935). — Siehe auch *W. Grassmann* und *F. Schneider*, *Biochem. Z.* **273**, 452 (1934).

zu früher erhaltenen Ergebnissen<sup>3, 16</sup> als auch auf Grund der Tatsache, daß auch aus dem isomeren Peptid N-Cbzo-Gly-D-Glu bei analoger Behandlung dasselbe Hydantoin, wenn auch — wie zu erwarten — in schlechterer Ausbeute, erhalten werden konnte, sehr unwahrscheinlich. Endgültig konnte aber die Struktur der vorliegenden Verbindung als die einer 5-( $\beta$ -Carboxy-äthyl)-hydantoin-3-essigsäure durch Abbau mit  $\text{NaBH}_4$ <sup>2, 3</sup> bewiesen werden, bei dem Colamin erhalten und papierchromatographisch identifiziert wurde, was nur mit der genannten Struktur in Einklang zu bringen ist.

Das Hydantoin wurde außer durch Analyse auch durch hydrolytische Aufspaltung zu Glycin und Glutaminsäure, seinen  $R_F$ -Wert (Tabelle 1) und durch Überführung in den Diäthylester identifiziert und charakterisiert.

Das für den Parallelversuch benötigte N-Cbzo- $\gamma$ -DL-Glu-Gly stellten wir durch Carbobenzoylierung des nach<sup>9</sup> erhaltenen Dipeptides dar.

Als diese Verbindung nun analog dem  $\alpha$ -Isomeren mit äthanol. NaOH und anschließend mit Säure behandelt wurde, konnte nach entsprechender Aufarbeitung durch Ätherextraktion (exper. Teil) praktisch keine ätherlösliche Substanz erhalten werden; wie ein Papierchromatogramm der wäßr. extrahierten Lösung anzeigte, war das Peptid in Glycin und Glutaminsäure gespalten worden.

Zuletzt wurde noch Glutathion<sup>17</sup> dem beschriebenen Abbau unterworfen. Zu diesem Zwecke wurde das Peptid nach *A. Schöberl*<sup>18</sup> mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum —S—S— Glutathion oxydiert, dieses carbobenzoyliert und die rohe Cbzo-Verbindung, wie beschrieben, mit Alkali und Säure behandelt. Auch hier lagen, wie beim  $\gamma$ -Glu-Gly, nur Spuren ätherextrahierbarer Substanz vor, während die wäßrige Lösung Glutaminsäure, Glycin und wenig Cystin (als Cysteinsäure nach Oxydation mit Perameisensäure) enthielt. Wahrscheinlich war die Hauptmenge des Cystins bei der Alkalibehandlung zerstört worden, denn als das Glutathion von vornherein mit Perameisensäure oxydiert worden war, fand sich nach dem Abbau, bei dem wieder praktisch keine ätherlösliche Substanz anfiel, im Chromatogramm Cysteinsäure in Mengen, die etwa dem Glycin bzw. der Glutaminsäure entsprachen.

Zur Identifizierung und Trennung der im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Glutaminsäurederivate leistete die an anderen Stellen<sup>1, 19</sup> beschriebene Methode zum papierchromatographischen Nachweis von Säuren mit Umbelliferon als Fluoreszenzindikator gute Dienste. Die  $R_F$ -Werte der Verbindungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

<sup>16</sup> *E. Ware*, Chem. Rev. **46**, 403 (1950).

<sup>17</sup> Für die kostenlose Überlassung sind wir der Fa. *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, zu großem Dank verpflichtet.

<sup>18</sup> *Z. physiol. Chem.* **201**, 167 (1931).

<sup>19</sup> *K. Schlögl* und *A. Siegel*, Mikrochem. **40**, 202 (1953).

Tabelle 1.  $R_F$ -Werte von Glutaminsäure-derivaten.  
Absteigend, Schleicher-Schüll 2043 b (rauh)<sup>20</sup>;  
n-Butanol-Äthanol-konz. Ammoniak-Wasser (4 : 4 : 1 : 1).

Verbindung	$R_F$ -Wert
D-Glutaminsäure . . . . .	0,05
Pyrrolidon- $\alpha$ -carbonsäure . . . . .	0,21
N-Cbzo-D-Glutaminsäure . . . . .	0,28
N-Cbzo- $\alpha$ -D-Glu-Gly . . . . .	0,22
N-Cbzo- $\gamma$ -DL-Glu-Gly . . . . .	0,24
N-Cbzo-Gly-D-Glu . . . . .	0,20
N-Phthalyl- $\gamma$ -DL-Glu-Gly . . . . .	0,08
Hydantoin I ( $R_1 = \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2$ , $R_2 = \text{H}$ ) . . .	0,04

Da es für die Unterscheidung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutamylpeptiden nach der Hydantoinmethode wertvoll schien, auch den Unterschied der entsprechenden N-Cbzo-Peptide bei der Hydrolyse in wäßr. Lösung zu kennen, wurden — wie eingangs erwähnt — Versuche zur Klärung dieser Frage unternommen.

*Quesne* und *Young*<sup>10</sup> hatten zwar schon  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glu-Gly in wäßr. Lösung 24 Stdn. bei 100° behandelt und in beiden Fällen Abspaltung von Glycin feststellen können, hatten aber keine Ergebnisse für kürzere Erhitzungszeiten angegeben, so daß zwischen beiden Peptiden kein qualitativer Unterschied festzustellen war; außerdem konnten diese Ergebnisse auch nicht ohne weiteres auf die Cbzo-Verbindungen übertragen werden.

Wir haben daher 1%ige wäßr. Lösungen von N-Cbzo- $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glu-Gly auf 100° erhitzt und von Zeit zu Zeit Proben entnommen, die papierchromatographisch untersucht wurden. Und zwar wurden auf zwei getrennten Chromatogrammen einerseits mit Ninhydrin die abgespaltenen Aminosäuren bestimmt und andererseits mit Umbelliferon als Indikator die sauren Spaltstücke nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 bzw. Abb. 1 wiedergegeben.

Daraus geht hervor:

Freie Glutaminsäure trat erst nach 72 Stdn. und da nur in Spuren auf, andererseits war aber in keinem Fall Cbzo-Glu nachzuweisen; es mußte also die Glutaminsäure maskiert vorliegen. Das konnte aber nach den bisherigen Erfahrungen<sup>6, 10</sup> nur in Form der Pyrrolidon- $\alpha$ -carbonsäure der Fall sein, deren  $R_F$ -Wert (Tabelle 1) sich aber von den unveränderten Cbzo-Peptiden praktisch nicht unterscheidet.

Umgekehrt war es aber unwahrscheinlich, daß z. B. beim  $\gamma$ -Peptid nach 72 Stdn. der aufgetretene Fleck im Chromatogramm 2 mit  $R_F = 0,21$  noch unverändertes Ausgangsmaterial darstellen sollte.

<sup>20</sup> Auf SS 2043 b (glatt) sind die  $R_F$ -Werte tiefer.

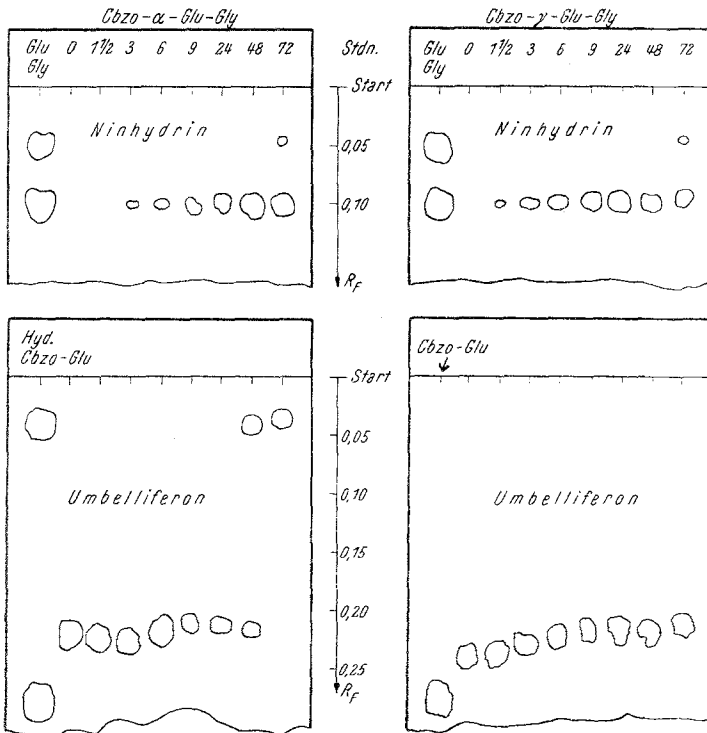


Abb. 1. Hydrolyse von Cbzo- $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glu-Gly in wäsr. Lösung bei 100°. Exp. Bedingungen siehe Tabelle 2.

Tabelle 2. Hydrolyse von Cbzo- $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glu-Gly.

Nach den angegebenen Zeiten wurden je 10 bzw. 3  $\mu$ l (100 bzw. 30  $\mu$ g) der 1%igen wäsr. Lösung entnommen und chromatographiert. Papier und Lösungsmittel siehe Tabelle 1.

Zeit in Stdn.	Chromatogramm 1 (Ninhydrin) je 30 $\mu$ g				Chromatogramm 2 (Umbelliferon) je 100 $\mu$ g	
	Cbzo- $\alpha$ -Glu-Gly		Cbzo- $\gamma$ -Glu-Gly		Cbzo- $\alpha$ -Glu-Gly	Cbzo- $\gamma$ -Glu-Gly
	Gly	Glu	Gly	Glu	R <sub>F</sub>	R <sub>F</sub>
0	—	—	—	—	0,22	0,24
1,5	—	—	+	—	0,22	0,24
3	+	—	++	—	0,23	0,23
4,5	+	—	+++	—	0,22	0,23
6	++	—	++++	—	0,22	0,22
9	+++	—	+++++	—	0,21	0,22
24	+++	—	+++++	—	0,21	0,22
48	++++	—	+++++	—	0,04	0,22
72	++++	+	+++++	+	0,03	0,21

Die Intensität der Ninhydrinreaktion wird angenähert wiedergegeben durch — nichts, + Spuren, ++ schwach, +++ mittel, ++++ stark.

Wir haben daher Cbzo-Glu unter analogen Bedingungen in wäßr. Lösung bei 100° behandelt und fanden, daß — wie Abb. 2 zeigt — schon nach 3 Stdn. nur mehr Pyrrolidoncarbonsäure vorlag, während freie Glutaminsäure (Ninhydrinchromatogramm!) auch nach 48 Stdn. noch nicht vorlag und nach 72 Stdn. wieder nur in Spuren nachzuweisen war.

Es geht daraus also hervor, daß abgespaltene Cbzo-Glu sich tatsächlich zur Pyrrolidoncarbonsäure cyclisiert bzw. unter den vorliegenden Bedingungen überhaupt schon als solche abgespalten wird.

Beim Cbzo- $\alpha$ -Peptid war bereits nach 48 Stdn., stärker jedoch nach 72 Stdn., parallel zur Abspaltung von Glycin auch Ringschluß zum Hydantoin eingetreten, wie der Fleck mit  $R_F$ -Wert von 0,04 beweist. Die dem abgespaltenen Glycin äquivalente Menge von Cbzo-Glu bzw. Pyrrolidoncarbonsäure liegt wahrscheinlich unter der für den Nachweis mit Umbelliferon notwendigen Menge von etwa 15 bis 20  $\mu$ g, bzw. lag ja nach 72 Stdn. etwas freie Glutaminsäure vor.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß auch im Falle der N-Cbzo-Verbindungen die Glutamylobindung in den  $\gamma$ -Derivaten labiler als in den  $\alpha$ -Verbindungen ist, was sich auch bei der Alkalibehandlung, die für die Unterscheidung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutamylopeptiden erforderlich ist, zweifellos in der oben (S. 265) erörterten Weise auswirken wird.

### Experimenteller Teil.

5-( $\beta$ -Carboxy-äthyl)-hydantoin-3-essigsäure I ( $R_1 = \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2$ ,  
 $R_2 = \text{H}$ ).

a) Aus N-Cbzo- $\alpha$ -D-Glutamyl-glycin-diäthylester: 1,18 g Cbzo- $\alpha$ -D-Glu-Gly-ester<sup>15</sup> wurden in 9 ml Äthanol gelöst, mit 9 ml 1 n NaOH (3 Mol) versetzt und 2 Stdn. am Wasserbad zum Sieden erhitzt. Die angesäuerte Lösung wurde im Vak. zur Trockene gedampft und der Rückstand 3 Stdn. mit 10 ml konz. HCl zum Sieden erhitzt. Den Abdampfrückstand nahmen wir in Wasser auf, saugten von ungelöstem Hydantoin, das mit Wasser Cl<sup>-</sup>-frei gewaschen wurde, ab (0,33 g, Schmp. 178 bis 181°<sup>21</sup>) und extrahierten die vereinigten Mutterlaugen und Washwässer 48 Stdn. mit Äther. Aus dem Äther fiel bereits während der Extraktion das Hydantoin in Nadeln

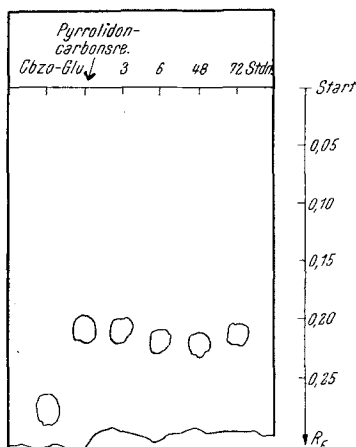


Abb. 2. Hydrolyse von Cbzo-Glutaminsäure in wäßr. Lösung. Exp. Bedingungen wie in Tabelle 2 angegeben. Chromatogramm mit Umbelliferon entwickelt.

<sup>21</sup> Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktapparat nach Kofler bestimmt.

aus, die 0,25 g wogen und von 179 bis 181° schmolzen. Gesamtausbeute 0,58 g (84% d. Th.). Aus Wasser Prismen. Schmp. 179 bis 181°.

$C_8H_{10}O_6N_2$ . Ber. C 41,74, H 4,38, N 12,14. Äqu.-Gew. 115,08.  
Gef. C 41,53, H 4,46, N 11,90. Äqu.-Gew. 116 (Tit.).

Nach 5stünd. Hydrolyse mit HCl bei 150° fanden sich im Papierchromatogramm Glycin und Glutaminsäure.

b) Aus *N*-Cbzo-Glycyl-*D*-glutaminsäure-diäthylester: 1,18 g *N*-Cbzo-Dipeptidester (dargestellt nach<sup>22</sup>) behandelten wir, wie oben beschrieben, mit 18 ml 0,5 n Äthanol. NaOH (3 Mol) 2 Stdn. am Wasserbad und noch 3 Stdn. mit HCl. Hierauf wurde der Abdampfrückstand 48 Stdn. mit Äther extrahiert. Ausbeute 0,23 g (33% d. Th.). Aus Wasser Prismen vom Schmp. 179 bis 181°, die keine Depression im Mischschmp. mit dem nach a) gewonnenen Hydantoin zeigten und sich auch im Papierchromatogramm (Tabelle I) als identisch erwiesen.

#### Konstitutionsermittlung des Hydantoins mit $NaBH_4$ .

0,10 g Hydantoin wurden mit 5 ml  $SOCl_2$  bis zur Lösung am Wasserbad erwärmt (3 Stdn.). Der Abdampfrückstand wurde mehrere Stdn. über KOH im Exsikkator getrocknet, hierauf in 5 ml absol. Dioxan gelöst und mit 0,070 g  $NaBH_4$  3 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Der Abdampfrückstand wurde vorsichtig mit Wasser zersetzt, mit HCl eben angesäuert und 24 Stdn. mit Äther extrahiert. Den Ätherrückstand hydrolysierten wir 4 Stdn. mit HCl bei 150°, dampften hierauf im Vak. ab und chromatographierten aliquote Teile des Hydrolysats. Erst ab etwa 100  $\mu$ g konnte Colamin nachgewiesen werden. Dieses wird nämlich, wie in Parallelversuchen festgestellt wurde, unter den hier angewandten Bedingungen (4 Stdn., 150°) in beträchtlichem Maße zerstört. Außerdem fanden sich im Chromatogramm noch geringe Mengen Glycin und Spuren Glutaminsäure, die wahrscheinlich von nicht reduziertem Hydantoin herrührten. Die Glutaminsäure mußte zur  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxy-valeriansäure reduziert worden sein. Tatsächlich war ein schwacher Fleck mit einem *R<sub>F</sub>*-Wert von 0,14 festzustellen, der dieser Säure entsprechen dürfte<sup>13</sup> (Lösungsmittel und Papier siehe Tabelle 1).

#### 5-( $\beta$ -Carbäthoxy-äthyl)-hydantoin-3-essigsäure-äthylester.

0,15 g Hydantoin wurden in 15 ml absol. Äthanol gelöst, die Lösung mit HCl-Gas gesättigt und 30 Min. zum Sieden erhitzt. Der Abdampfrückstand ließ sich aus Äther-Petroläther umlösen. Prismen vom Schmp. 43 bis 45°. Ausbeute 0,13 g (70% d. Th.).

$C_{12}H_{18}O_6N_2$ . Ber. C 50,34, H 6,34, N 9,79,  $OC_2H_5$  31,44.  
Gef. C 50,07, H 6,26, N 10,17,  $OC_2H_5$  32,08.

#### *N*-Cbzo-Glycyl-*D*-glutaminsäure.

0,6 g des Diäthylesters<sup>22</sup> wurden in 5 ml Äthanol gelöst und mit 5 ml 1 n NaOH (3,3 Mol) 3 Stdn. bei Zimmertemp. verseift. Hierauf wurde mit konz. HCl eben angesäuert und im Vak. auf etwa 4 ml eingengt. Das ausfallende Öl erstarrte nach einiger Zeit im Eisschrank. Ausbeute 0,32 g (63% d. Th.). Aus Äthanol-Äther-Petroläther Nadelbüschel. Schmp. 163 bis 165°. (Die Literatur<sup>23</sup> gibt für das *L*-Isomere als Schmp. 160 bis 162° und ein

<sup>22</sup> V. Prelog und P. Wieland, *Helv. Chim. Acta* **29**, 1128 (1946).

<sup>23</sup> K. Hofmann und M. Bergmann, *J. Biol. Chem.* **134**, 225 (1940).



$[\alpha]_D^{42}$  von  $+4,0^\circ$  an.)  $[\alpha]_D^{20} = +5,4^\circ$  ( $\alpha = +0,3^\circ$ ,  $l = 2$  dm,  $c = 2,76$  in Äthanol).

$C_{15}H_{18}O_7N_2$ . Ber. N 8,28, Äqu.-Gew. 169,13.

Gef. N 8,19, Äqu.-Gew. 168,9 (Titration).

*N-Cbzo- $\gamma$ -DL-Glutamyl-glycin.*

2,5 g rohes Dipeptid<sup>9</sup> lösten wir in 25 ml Wasser, versetzten mit 2,0 g MgO, überschichteten mit 15 ml Äther und acylierten unter Eiskühlung mit 3 g (1,5 Mol) Benzylchlorokohlensäureester. Nach 40 Min. wurde 3mal mit Äther ausgeschüttelt, die wäßr. Lösung mit HCl angesäuert und mehrfach mit Chloroform und Essigester durchgeschüttelt. Die vereinigten Lösungsmittel wurden im Vak. verdampft und lieferten 0,6 g (14% d. Th.) festen Rückstand. Aus wenig Äthanol-Äther-Petroläther Nadeln. Schmp. 107 bis 109°. Die Substanz ist gut löslich in Wasser und Äthanol, schwer löslich in Essigester und Chloroform und fast unlöslich in Äther.

$C_{15}H_{18}O_7N_2$ . Ber. C 53,25, H 5,36, N 8,28. Gef. C 53,27, H 5,60, N 8,34.

Nach 4stünd. Kochen mit HCl (konz.) fanden sich im Papierchromatogramm Glycin und Glutaminsäure.

*Umlagerungsversuche.*

a) Am *N-Cbzo- $\gamma$ -DL-Glu-Gly*: 0,121 g Cbzo-Dipeptid wurden, wie bereits beschrieben, mit 2,2 ml 0,5 n äthanol. NaOH erhitzt und anschließend mit HCl behandelt. 48stünd. Extraktion mit Äther lieferte nur 3 mg Rückstand. Die wäßr. Lösung aus dem Extraktor zeigte im Papierchromatogramm Glycin und Glutaminsäure.

b) Am *Glutathion*: 1. Oxydation mit  $H_2O_2$ . 0,10 g SH-Glutathion<sup>17</sup> lösten wir in 1 ml Wasser, gaben eine Spur Mohrsches Salz zu und versetzten unter Eiskühlung mit 0,02 g Perhydrol in 0,5 ml Wasser. Nach 3stünd. Stehen bei Zimmertemp. wurde mit 1 ml Wasser verdünnt und diese Lösung zur anschließenden Carbobenzoylierung verwendet.

2. Oxydation mit Perameisensäure. 0,10 g SH-Glutathion wurde in 10 ml Ameisensäure gelöst und mit 1,0 ml Perhydrol versetzt. Nach 15 Min. wurde mit Wasser verdünnt und im Vak. bei etwa 30° eingedampft. Der Rückstand wurde in 3 ml Wasser gelöst und zur Carbobenzoylierung verwendet.

Die nach 1 oder 2 erhaltene wäßr. Lösung wurde mit 0,10 g  $NaHCO_3$  und 0,1 ml Benzylchlorokohlensäureester unter Eiskühlung acyliert. Nach dem Ausschütteln mit Äther wurde mit HCl angesäuert, im Vakuumexsikkator über konz.  $H_2SO_4$  zur Trockene gedampft und der Rückstand mit Essigester, Chloroform und Aceton ausgekocht. Den Abdampfrückstand (in beiden Fällen etwa 70 mg) behandelten wir wieder mit Lauge und Säure. 2tägige Extraktion mit Äther ergab in beiden Fällen nur Spuren Substanz (2 bzw. 4 mg).

Die wäßr. Lösungen aus dem Extraktor wurden im Vak. verdampft, der Trockenrückstand mit Aceton zur Entfernung von NaCl ausgekocht und im Fall 1 der Acetonrückstand mit Perameisensäure oxydiert. Im Papierchromatogramm mit Phenol als mobiler Phase fanden sich schließlich viel Glycin und Glutaminsäure neben wenig Cysteinsäure, während im Fall 2, wo schon primär mit Perameisensäure oxydiert worden war, Cysteinsäure in etwa äquivalenten Mengen vorlag.

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