

Konstitutionsermittlung von Peptiden. VI. Lysylpeptide.

XI. Mitteilung über Peptide¹.

Von

K. Schlögl und **H. Fabitschowitz**.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 5. Juli 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Oktober 1953.)

Eine früher beschriebene Methode zur Konstitutionsermittlung von Peptiden wurde auf Lysylpeptide ausgedehnt. Dabei auftretende Schwierigkeiten, die durch den amphoteren Charakter der Lysin enthaltenden substituierten Hydantoin-3-essigsäuren III bedingt waren, konnten durch Umsetzung der Gemische aus III und den Aminosäuren mit Phenylisocyanat überwunden werden. Damit gelingt es, die substituierten Hydantoin-essigsäuren IV von den aus den Aminosäuren erhaltenen 3-Phenylhydantoinen VI abzutrennen und nach Hydrolyse der ersteren (IV) die aminoendständige und die ihr benachbarte Aminosäure zu bestimmen.

Das Verfahren bewährte sich an mehreren, bisher nicht beschriebenen Lysylpeptiden (Lys-Gly, Lys-Val, Lys-Gly-Phe und Lys-Val-Phe) und dem Protein Lysozym.

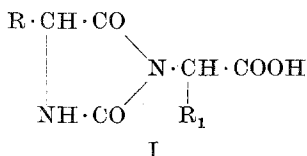
Die R_F -Werte einer größeren Anzahl von Aminosäure- und Peptidderivaten wurden ermittelt.

Die in früheren Mitteilungen^{2,3} beschriebene Methode zur Konstitutionsermittlung von Peptiden basiert auf der Möglichkeit, die Aminosäure und die ihr benachbarte als substituierte Hydantoin-3-essigsäure I abzuspalten.

¹ X. Mittlg.: K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich, Mh. Chem. **84**, 705 (1953).

² F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. **83**, 1156 (1952). — F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, ebenda **83**, 1426, 1439 (1952); **84**, 263 (1953).

³ K. Schlögl, A. Siegel und F. Wessely, Z. physiol. Chem. **291**, 265 (1952).



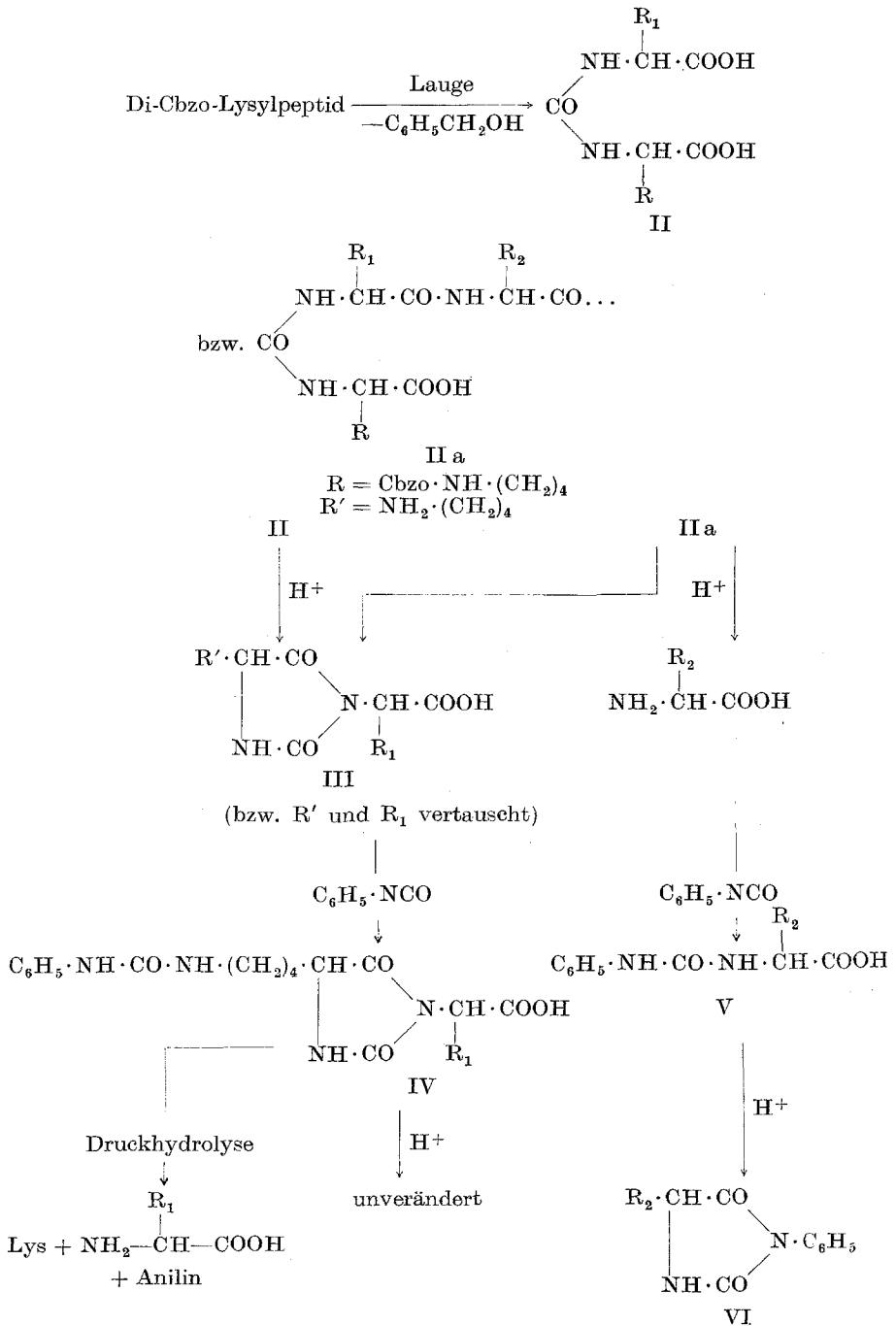
Die Abtrennung solcher Hydantoinen von den restlichen Aminosäuren des Peptides bietet keinerlei Schwierigkeiten, solange es sich bei den beiden, den Hydantoinring bildenden Aminosäuren, um Monoamino-mono-² oder Monoamino-dicarbon-säuren² handelt. In allen diesen Fällen besitzt I ja Säurecharakter und kann somit aus der sauren Lösung der Aminosäuren leicht abgetrennt werden.

Schwierigkeiten waren jedoch bei Peptiden von Diamino-mono-carbonsäuren, wie etwa Lysylpeptiden, zu erwarten, da R oder R₁ dann von der Gruppe NH₂ · (CH₂)₄ gebildet wird, die erhaltenen Hydantoinen somit amphoterer Charakter besitzen und von den Aminosäuren nicht mehr abtrennbar sind.

Im Hinblick auf die Bedeutung, die endständigen Lysinresten bei manchen Peptiden und Proteinen zukommt, sowie um näheren Einblick in die Chemie der verhältnismäßig noch wenig untersuchten Lysylpeptide zu gewinnen, haben wir uns mit der Synthese und dem Abbau solcher Peptide etwas näher befaßt, worüber im folgenden berichtet werden soll.

Bei der Umlagerung von Di-Cbzo-Lysylpeptiden in die Carbonyl-bis-aminosäuren II bzw. Carbonyl-aminosäure-peptide IIa mit Lauge in der üblichen Weise² waren nach den bisherigen Erfahrungen keine Schwierigkeiten zu erwarten. Diese mußten — wie erwähnt — erst auftreten, wenn es galt, nach Ringschluß von II oder IIa die erhaltenen Hydantoinen III mit der freien Amino- und Carboxylgruppe von den restlichen Aminosäuren zu trennen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, war es nötig, eine der beiden Gruppen, vorteilhaft die ε-Aminogruppe des Lysins, derart zu substituieren, daß von den gleichzeitig vorliegenden und ebenfalls an der Aminogruppe substituierten Aminosäuren abtrennbare Verbindungen entstanden.

Dazu wählten wir Phenylisocyanat als Reagens. Setzt man nämlich das Gemisch von Lysyl-hydantoinen III und Aminosäuren mit Phenylisocyanat um und erwärmt das rohe Reaktionsprodukt kurz mit Säure, so bleiben die substituierten Hydantoin-3-essigsäuren IV (in Hinkunft kurz „Phenylureido-hydantoin“ genannt) unverändert, während die sich von den Aminosäuren ableitenden Harnstoffe V leicht zu den substituierten 3-Phenyl-hydantoinen VI ringschließen. Die sauren Verbindungen IV können der Reaktionsmischung mit Sodalösung entzogen, somit von den Hydantoinen VI abgetrennt und nach entsprechender Aufarbeitung hydrolysiert werden. Zweckmäßig erwies es sich, IV als



Säuren zu chromatographieren³ (siehe Tabelle 1), dadurch rein zu erhalten und erst vom Papier in einer früher beschriebenen Weise³ zu eluieren und dann zu hydrolysieren.

Das genannte Verfahren wurde an den Lysylpeptiden DL-Lys-Gly, DL-Lys-DL-Val, DL-Lys-Gly-DL-Phe und DL-Lys-DL-Val-DL-Phe⁴ sowie am Lysozym, das nach Untersuchungen von Schröder⁵ Lys-Val-Phe-Gly als aminoendständige Aminosäurefolge enthält, erprobt und lieferte in allen Fällen eindeutige Ergebnisse.

Im folgenden sollen nun die an den einzelnen Peptiden gesammelten Erfahrungen und erhaltenen Ergebnisse näher besprochen werden.

Sämtliche genannten Peptide waren bisher in der Literatur noch nicht beschrieben — vom Lys-Gly war nur das L-Lysylderivat bekannt⁶ — und wurden teils nach dem Cbzo-Verfahren durch Kupplung von Di-Cbzo-Lysyl-azid mit dem Aminosäure(Peptid)ester (Methode A), besser aber durch Umsetzung des aus Di-Cbzo-Lysin und Äthylchlorkohlensäureester erhaltenen Anhydrids^{7, 8} mit der Aminokomponente dargestellt (Methode B).

Bei der Methode B erwies sich Umsetzung mit dem Na-Salz der freien Aminosäure — wie sie z. B. bei der Darstellung von Leu-Phe verwendet worden war⁶ — besonders im Falle des Val-Phe als wenig vorteilhaft, da laut Chromatogramm (Tabelle 1) das erhaltene Cbzo-Val-Phe mit Cbzo-Val verunreinigt war, das nicht abgetrennt werden konnte; bei der Umsetzung mit der Ester dagegen bietet eine Reinigung keine Schwierigkeiten. Als tertiäres Amin⁷ bewährte sich Tri-isoamylamin; nur ist zu beachten, daß sein Chlorhydrat, das bei der Umsetzung entsteht, verhältnismäßig schwer wasserlöslich ist und die Reaktionsmischung daher öfter mit Wasser ausgeschüttelt werden muß.

Die Schmelzpunkte der einzelnen Cbzo-peptidester und auch der übrigen Peptid-derivate waren, soweit die Verbindungen in fester Form, dann aber meist nur amorph, erhalten werden konnten, durchwegs unscharf, was wohl auf die Verwendung racemischer Aminosäuren und damit auf die Bildung mehrerer Racemate zurückgeführt werden muß.

⁴ In allen Fällen wurden racemische Aminosäuren verwendet; es fällt im folgenden daher die Bezeichnung DL- weg.

⁵ W. A. Schröder, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 281, 5118 (1952).

⁶ M. Brenner und C. H. Burckhardt, Helv. Chim. Acta **34**, 1070 (1951). — M. Bergmann u. a., Z. physiol. Chem. **224**, 26 (1934).

⁷ Th. Wieland und H. Bernhard, Ann. Chem. **572**, 190 (1951). — R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta **34**, 874 (1951). — J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 5553 (1951). — J. R. Vaughan, ebenda **73**, 3547 (1951).

⁸ I. Schumann und R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta **35**, 223, 2237 (1952).

Lysyl-glycin.

Di-Cbzo-Lys-Gly-äthylester, der mit 1 Mol Lauge glatt zum Di-Cbzo-Dipeptid verseift werden konnte, erlitt bereits bei der Behandlung mit einem Alkaliüberschuß (2 bis 4 Mol) in der Kälte Umlagerung zum Harnstoff II ($R_1 = H$). Dieselbe Verbindung konnte auch beim Erwärmen mit 2 und 3 Mol wäßriger und wäßrig-äthanolischer NaOH erhalten werden. Der dabei beim intermediären Ringschluß² abgespaltene Benzylalkohol konnte papierchromatographisch⁹ identifiziert werden.

Die ϵ -Cbzo-Gruppe des Lysins ist in allen Fällen gegen Lauge stabil. Dies zeigten papierchromatographische Untersuchungen einer auf 100° erhitzten Lösung von ϵ -Cbzo-Lysin in 3 Mol 0,5 n NaOH, der von Zeit zu Zeit Proben entnommen und chromatographiert wurden. Erst nach 24 Stdn. war nur mehr Lysin vorhanden, während saure Verseifung (HCl 1 : 1) bereits nach 5 Min. (100°) zur völligen Abspaltung des Cbzo-Restes geführt hatte.

Die überaus große Tendenz der Di-Cbzo-Lysylpeptidester, in alkalischem Medium unter Benzylalkoholabspaltung zum Harnstoff II (oder IIa) umzulagern, machte sich in noch stärkerem Maße bei den Cbzo-Tripeptidestern bemerkbar; dort trat schon bei Behandlung mit 1 Mol NaOH in Aceton neben Verseifung zum Cbzo-Tripeptid Umlagerung zu IIa ein.

S. G. Waley und *J. Watson*¹⁰ machten kürzlich im Zuge der Darstellung von Lysylpeptiden vom Di- bis zum Pentalysin ebenfalls die Beobachtung der leichten Bildung von Harnstoffen der Formel IIa.

Das Carbonyl-(ϵ -Cbzo-lysin)-(glycin) II ($R_1 = H$) gab nach kurzem Erhitzen mit HCl am Chromatogramm neben etwas Gly und Lys eine mit Ninhydrin nachweisbare Substanz, die nach Eluieren und Druckhydrolyse wieder Gly und Lys lieferte und das freie Hydantoin III ($R_1 = H$) darstellt. Umsetzung dieser Verbindung mit Phenylisocyanat führte zur 5-(δ -Phenylureido-*n*-butyl)-hydantoin-3-essigsäure IV ($R_1 = H$), die durch Schmelzpunkt, Analyse und R_f -Wert (Tabelle 1) charakterisiert wurde. Bei der Druckhydrolyse mit HCl gab sie wieder Gly und Lys.

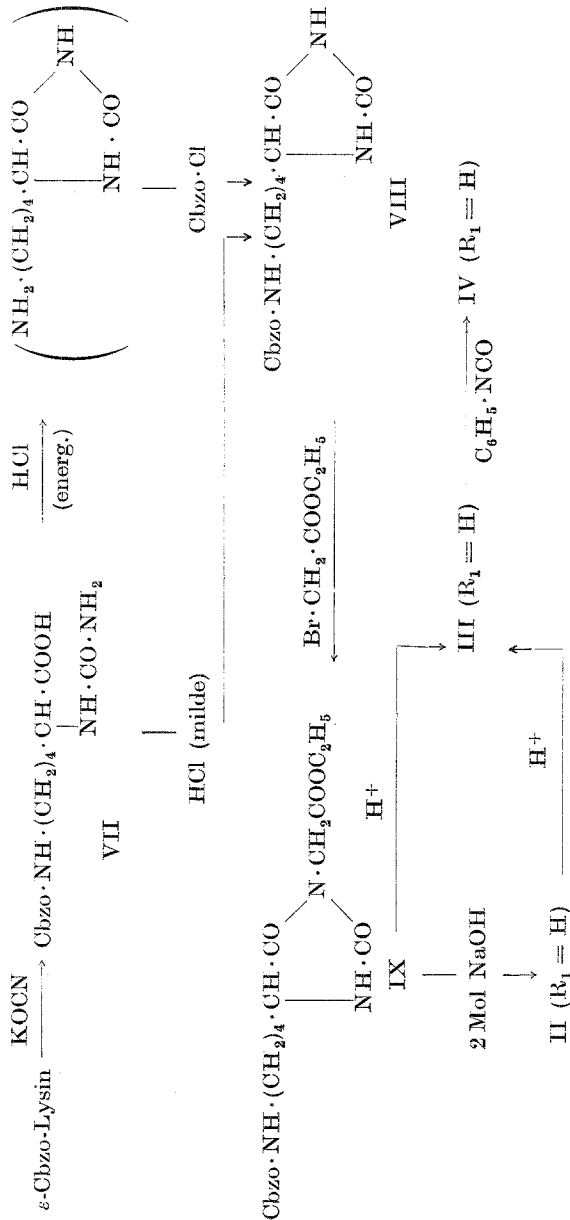
Zum Strukturbeweis der genannten Hydantoine, die sich vom Lys-Gly ableiten — theoretisch wären ja auch noch die anderen möglichen Formen mit vertauschten Resten in Betracht zu ziehen —, führten wir die Synthese dieser Verbindungen auf folgendem eindeutigen Wege durch:

Der Cu-Komplex des Lysins wurde mit Cbzo-Chlorid zum ϵ -Cbzo-Lys umgesetzt, eine Darstellung, die der bisher üblichen durch Zersetzung von ϵ -Cbzo-Lysin-*N*-carbonsäure-anhydrid mit HCl¹¹ überlegen ist. ϵ -Cbzo-

⁹ *A. Siegel* und *K. Schlögl*, Mikrochem. 40, 383 (1953).

¹⁰ *J. Chem. Soc. London* 1953, 475.

¹¹ *M. Bergmann*, *L. Zervas* und *W. F. Ross*, J. Biol. Chem. 111, 245 (1935). — *J. P. Greenstein*, J. Org. Chem. 2, 480 (1937).



Lys konnte dann mit KOCN in die Hydantoin säure VII übergeführt werden und diese ließ sich bei vorsichtiger HCl-Behandlung teils direkt in das Hydantoin VIII umwandeln, teils wurde dieses nach energischer Säurebehandlung von VII durch nachträgliche Carbobenzoylierung

erhalten. Umsetzung des Na-Salzes von VIII mit Bromessigsäure-äthylester führte schließlich zum 5-[δ -(Cbzo-Amino)-*n*-butyl]-hydantoin-3-essigsäure-äthylester IX, der nach Aufspaltung mit 2 Mol Alkali das gewünschte Cbzo-Lys-CO-Gly II ($R_1 = H$) lieferte, das sich im Chromatogramm mit der aus dem Cbzo-Dipeptidester erhaltenen Verbindung als identisch erwies, während die Schmelzpunkte differierten. Es wiesen aber auch die aus verschiedenen Ansätzen durch Laugebehandlung aus dem Cbzo-Lys-Gly-ester erhaltenen Harnstoffe II ($R_1 = H$) untereinander deutliche Schmelzpunktdifferenzen auf, während sie papierchromatographisch identisch waren. Diese Differenzen können eventuell durch partiellen Ringschluß der Harnstoffe zu den Hydantoinpeptiden erklärt werden^{2, 12}.

Die Phenylureido-hydantoin-IV ($R_1 = H$) aber, die sowohl aus sauer verseiftem IX, als auch aus dem säurebehandelten synthetischen Harnstoff II ($R_1 = H$) gewonnen worden waren, erwiesen sich mit der aus dem Cbzo-Peptidester erhaltenen Verbindung nach Schmp., Mischschmp. und R_f -Wert als identisch.

Lysyl-glycyl-phenylalanin.

Der Di-Cbzo-Lys-Gly-Phe-ester, der nach Methode A aus Cbzo-Lysyl-azid und Gly-Phe-äthylester erhalten wurde, ließ sich nicht mehr eindeutig — auch nicht mit 1 Mol Lauge — zum Di-Cbzo-Tripeptid verseifen. Dem Verseifungsprodukt, das laut Chromatogramm 2 Verbindungen enthielt, konnte jedoch mit verd. Sodalösung das stärker saure Carbonyl-aminosäure-peptid Cbzo-Lys-CO-Gly-Phe IIa ($R_1 = H$, $R_2 = \text{Benzyl}$) bevorzugt entzogen und rein erhalten werden.

Direkte Umlagerung des Cbzo-Tripeptidesters mit 2 Mol Lauge in der Wärme gab nur mehr den Harnstoff, der nach Behandlung mit Säure im Chromatogramm viel Phe und Hydantoin III ($R_1 = H$) neben wenig Lys und Gly zeigte. Umsetzung dieses Gemisches mit Phenylisocyanat, Erhitzen des Reaktionsproduktes mit Säure und Ausschütteln der Essigesterlösung des Rückstandes mit Soda gab eine Phenylureido-hydantoin-3-essigsäure IV ($R_1 = H$), die mit der aus Cbzo-Lys-Gly-ester erhaltenen nach Schmp., Mischschmp. und Chromatogramm identisch war und bei Hydrolyse ausschließlich Gly und Lys ergab, womit die Abtrennung der beiden endständigen Aminosäuren des Tripeptides gelungen war.

Lysyl-valin und Lysyl-valyl-phenylalanin.

Als nächste Peptide wurden Lys-Val und Lys-Val-Phe gewählt, weil diese Aminosäurefolge im Lysozym auftritt⁵ und wir damit Vergleichsmöglichkeiten für die Untersuchung des Lysozyms zu erhalten hofften.

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

Di-Cbzo-Lys-Val-ester, dargestellt nach Methode A und B (S. 940), konnte nur als Öl erhalten werden. Auch hier führte alkalische Verseifung mit 1 Mol NaOH wieder zu einem Gemisch des Cbzo-Dipeptides und des Harnstoffes II ($R_1 = \text{Isopropyl}$), während 5stünd. Kochen mit HCl (1 : 1) im Chromatogramm außer den zu erwartenden Aminosäuren Lys und Val noch 2 weitere Flecke lieferte, die zwischen den genannten Aminosäuren lagen (Tabelle 1). Da es nach den Hydrolysebedingungen unwahrscheinlich schien, daß es sich noch um unverändertes Peptid — zumindest bei einem der beiden Flecke — handelte, mußten wir annehmen, daß die fraglichen Flecke bereits die freien Hydantoine vorstellten. Hydantoine deshalb, weil ja mit der Bildung von 2 Isomeren (III, $R_1 = \text{Isopropyl}$ bzw. R' und R_1 vertauscht) gerechnet werden konnte, die sich hier infolge der verschiedenen Verteilung der polaren Gruppen in den beiden möglichen Formen schon merklich in ihren R_F -Werten unterscheiden sollten; eine solche Unterscheidung konnte bei normalen isomeren Hydantoin-3-essigsäuren ohne Aminogruppen früher nicht beobachtet werden³ und war in diesen Fällen auch nicht zu erwarten.

Beide Flecke gaben nach Eluieren, Druckhydrolyse und erneutem Chromatographieren Lys und Val, was ebenfalls zugunsten der Annahme der beiden Hydantoine spricht.

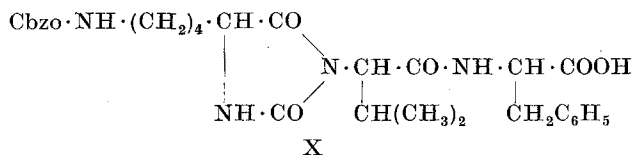
Dieselben beiden Flecke traten in viel stärkerem Maße nach normaler Umlagerung des Di-Cbzo-Lys-Val-esters mit Lauge und anschließender Säurebehandlung des Harnstoffes II ($R_1 = \text{Isopropyl}$) im Chromatogramm auf (Abb. 1). Wurde nun wieder in üblicher Weise mit Phenylisocyanat umgesetzt und die Phenylureido-hydantoine IV ($R_1 = \text{Isopropyl}$ oder Vertauschung der Gruppen) normal abgetrennt, so erhielt man ein nicht kristallisierendes Öl, das diesmal im Chromatogramm nur einen Fleck gab. Es handelt sich dabei aber wahrscheinlich wieder um ein Gemisch der beiden möglichen Hydantoine (IV), die jedoch nach Aufhebung der oben erwähnten Polarität am Chromatogramm nicht mehr trennbar sind.

Um eine weitere Klärung der Verhältnisse zu erreichen, stellten wir noch das freie Dipeptid Lys-Val durch Hydrierung von Di-Cbzo-Lys-Val-benzylester dar, der nach Methode B aus Di-Cbzo-Lys und Val-benzylester gewonnen worden war. Auch der Di-Cbzo-Lys-Val-benzylester gab analog dem Äthylester nach saurer Hydrolyse (5 Stdn., HCl 1 : 1) im Chromatogramm wieder einen deutlichen Fleck zwischen Lys und Val (der untere der beiden Hydantoinflecke trat immer erst bei größerer Konzentration auf, was vielleicht auf die verschiedene Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion zurückgeführt werden kann); das freie, durch Hydrierung gewonnene Dipeptid lieferte dagegen nur einen Fleck, dessen R_F -Wert dem des fraglichen Hydantoinfleckes allerdings sehr ähnlich war (Tabelle 1).

Es war nun — da im Ninhydrinchromatogramm eine Unterscheidung zwischen Dipeptid und Hydantoin nicht möglich schien — auf anderem Wege zu beweisen, daß schon im Di-Cbzo-Lys-Val-ester (möglicherweise durch die Aufarbeitung) und damit dann im Dipeptid eine bzw. beide der möglichen Hydantoin-3-essigsäuren aus Val und Lys vorlagen.

Diesen Beweis lieferten wir durch Umsetzung des durch Hydrierung gewonnenen Lys-Val mit Phenylisocyanat, wobei wir die Di-Phenylisocyanatverbindung des Dipeptides und die des Hydantoins (IV, $R_1 = \text{Isopropyl}$) trennen konnten; erstere ließ sich rein erhalten und wies einen wesentlich höheren R_F -Wert als letztere auf (0,69 gegen 0,26; Tabelle 1), die laut Chromatogramm mit dem aus dem Di-Cbzo-dipeptid-ester via Cbzo-Lys-CO-Val gewonnenen Phenylureidohydantoin identisch war.

Endlich untersuchten wir noch den Di-Cbzo-Lys-Val-Phe-äthylester, der nach Methode B durch Umsetzung mit Val-Phe-ester erhalten worden war. Die zuerst genannte Verbindung, die fest gewonnen werden konnte, war, wie zu erwarten, nicht definiert zum Cbzo-Tripeptid zu verseifen, ließ sich aber leicht mit 2 Mol Alkali in das Carbonyl-aminosäure-peptid IIa ($R_1 = \text{Isopropyl}$, $R_2 = \text{Benzyl}$) umlagern. Es gab nach Erhitzen mit HCl im Chromatogramm neben viel Phe und wenig Lys und Val diesmal nur einen Hydantoinfleck, der mit dem unteren der beiden aus dem Cbzo-Dipeptid (Lys-Val) erhaltenen identisch war (Abb. 1). Dies erklärt sich zwanglos durch die Annahme, daß das Carbonyl-aminosäure-peptid Cbzo-Lys-CO-Val-Phe mit Säure primär zum Hydantoinpeptid X^{12} ringschließen wird (vor allem auch wegen der verhältnismäßig großen Stabilität der Val-Phe-Bindung) und dann aus diesem Hydantoinpeptid X



nur mehr *ein* Hydantoin (III, $R_1 = \text{Isopropyl}$) abgespalten werden kann. Der Ringschluß von Cbzo-Lys-CO-Val dagegen konnte natürlich zwanglos in beiden Richtungen erfolgen, damit beide mögliche Hydantoine und somit 2 Flecke liefern. Mithin scheint auch die Struktur der den beiden Flecken zugrunde liegenden Hydantoine festgelegt (vgl. Tabelle 1).

Übliche Umsetzung des säurebehandelten Carbonyl-aminosäure-peptides mit Phenylisocyanat und Abtrennung des Phenylureido-hydantoins ergab schließlich ein Produkt, das laut Chromatogramm mit dem aus dem Dipeptid Lys-Val gewonnenen identisch war und nach Eluieren mit Äthanol³, Hydrolysieren und erneutem Chromatographieren nur mehr Lys und Val gab.

Lysozym.

Als letztes Beispiel für den modifizierten Abbau von Lysylpeptiden wählten wir das im Vergleich zu den bisher beschriebenen Peptiden wesentlich komplexer gebaute Protein Lysozym vom Molekulargewicht 14900¹³. Es ist uns klar, daß es nach dem im folgenden be-

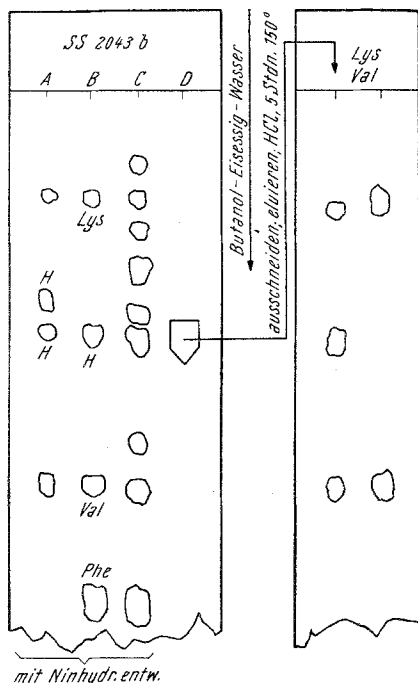


Abb. 1. Abbau von Lysozym.

- A: Säurebehandeltes ϵ -Cbzo-Lys-CO-Val.
 B: Säurebehandeltes ϵ -Cbzo-Lys-CO-Val-Phe.
 C, D: Mit Lauge umgelagertes und mit HCl hydrolysiertes Cbzo-Lysozym. C (50 μ g); D (500 μ g, nicht mit Ninhydrin entwickelt).
 H: „Hydantoinflecke“.

hervorgegangen, daß es — wahrscheinlich wegen der glatten Säurelöslichkeit — schon nach 2 Stdn. Kochen mit konz. HCl quantitativ hydrolysiert gewesen sein dürfte, da im eindimensionalen Durchlaufchromatogramm (Butanol-Eisessig-Wasser) bereits dieselben Flecke vorlagen, die auch nach 10 Stdn. vorhanden waren (siehe Abb. 1). Andererseits zeigte es sich, daß die fraglichen Hydantoine aus Lys und Val auch nach 5stünd.

beschriebenen Verfahren nicht gelungen wäre, die beiden endständigen Aminosäuren zu bestimmen, wenn deren Natur nicht bekannt gewesen wäre⁵ und wir somit nicht die Möglichkeit gehabt hätten, das zu erwartende Hydantoin aus synthetischen Vergleichspeptiden zu gewinnen. Wir wollten aber hier nur den Beweis erbringen, daß die Umlagerung von Cbzo-Peptiden zu den Harnstoffen auch im Falle sehr langer Peptidketten möglich ist und somit die Bestimmung der Aminosäure und der ihr benachbarten prinzipiell nicht nur auf niedrigere Peptide beschränkt ist.

Es wurde also reines kristallisiertes Lysozym bei einem pH von 8 bis 9 mit Benzylchlorkohlen-säureester umgesetzt, das erhaltene Cbzo-Lysozym, das zum Unterschied vom reinen Protein in Essigsäure unlöslich war, mit 0,3 n NaOH erhitzt und hierauf sofort der Hydrolyse mit HCl unterworfen.

Aus vergleichenden Hydrolyseversuchen beim freien Lysozym war

¹³ J. C. Lewis, N. S. Snell, D. J. Hirschmann und H. Fraenkel-Conrat, J. Biol. Chem. 186, 23 (1950).

Kochen noch weitgehend unverändert vorlagen, so daß wir auf Grund dieser Befunde für das umgelagerte Cbzo-Lysozym eine Hydrolysendauer von 4 Stdn. wählten. Aus dem Chromatogramm dieses Hydrolysates, das sich im Aussehen nicht von dem eines reinen hydrolysierten Lysozyms unterschied (Abb. 1), wurde der Fleck ausgeschnitten und mit Wasser eluiert, der dem zu erwartenden Hydantoin entsprechen mußte. Wenn dieses fragliche Hydantoin auch am Chromatogramm mit Aminosäuren von ähnlichem R_F -Wert (etwa Ala oder Pro) zusammenfiel, so mußte das Eluat nach Druckhydrolyse neben diesen unverändert ge-

Tabelle 1. R_F -Werte von Aminosäure- und Peptid-derivaten.
Papier: Schleicher & Schüll 2043a (rauh). Lösungsmittelgemische A, B, C (siehe Text). Absteigende Methode. Nachweis: N = Ninhydrin; U = 4-Methyl-umbelliferon.

Verbindung	Lösungsmittel			Nachweis
	A	B	C	
Di-Cbzo-Lys	0,70	0,80	—	U
ϵ -Cbzo-Lys	—	0,64	0,75	N
ϵ -Cbzo-Lys-hydantoinensäure (VII)	0,08	0,59	—	U
Cbzo-Val	0,59	0,72	—	U
Di-Cbzo-Lys-Gly	0,37	0,75	—	U
Cbzo-Val-Phe	0,70	0,79	—	U
Phenylisocyanat-Gly	0,14	0,54	—	U
Phenylisocyanat-Val	0,51	0,70	—	U
Di-Phenylisocyanat-Lys	0,68	0,76	—	U
Phenylisocyanat-Phe	0,54	0,73	—	U
Di-Phenylisocyanat-Lys-Val	0,69	0,77	—	U
ϵ -Cbzo-Lys-CO-Gly (II, $R_1 = H$)	0,00	0,33	—	U
ϵ -Cbzo-Lys-CO-Val (II, $R_1 =$ Isopropyl)	0,24	0,72	—	U
ϵ -Cbzo-Lys-CO-Gly-Phe (IIa, $R_1 = H$, $R_2 =$ Benzyl)	0,02	0,48	—	U
ϵ -Cbzo-Lys-CO-Val-Phe (IIa, $R_1 =$ Isopropyl, $R_2 =$ Benzyl)	0,58	0,77	—	U
Hydantoin aus Lys und Gly (III, $R_1 = H$) ...	—	0,28	0,26	N
Hydantoin aus Lys und Val (III, $R_1 =$ Iso- propyl)	—	0,37	0,33	N
Hydantoin aus Lys und Val (III, R und R_1 vertauscht)	—	0,30	0,28	N
Lys — Val	—	0,28	0,27	N
Phenylureido-hydantoin aus Lys und Gly (IV, $R_1 = H$)	0,09	0,56	—	U
Phenylureido-hydantoin aus Lys und Val (IV, $R_1 =$ Isopropyl)	0,26	0,72	—	U

bliebenen Aminosäuren noch zusätzlich Lys und Val liefern, die infolge ihrer stark verschiedenen R_F -Werte leicht daneben nachweisbar waren.

Tatsächlich lagen nun im Chromatogramm des hydrolysierten Eluats geringe, aber deutliche Mengen Lys und Val vor, so daß damit der Beweis für die Anwendbarkeit des Verfahrens auch am Lysozym erbracht war.

Viele im Laufe dieser Arbeit auftretenden Fragen waren — wie mehrfach erwähnt — nur mit Hilfe der Papierchromatographie lösbar. In der folgenden Tabelle 1 sind die R_F -Werte der im Zuge unserer Untersuchungen erhaltenen Verbindungen angeführt. Die Substanzen, deren rationale Nomenklatur meist umständlich ist, sind nur abgekürzt bezeichnet. Es sind in der Tabelle 1 auch die Phenylisocyanatderivate der vier in Frage kommenden Aminosäuren (Gly, Val, Lys und Phe) enthalten. Der Nachweis der beiden letzteren gelingt nur in größeren Mengen (etwa 100 bis 200 μg), was auf die große Ringschlußtendenz zu den 3-Phenylhydantoinen VI zurückzuführen sein dürfte. Beim energischen Trocknen (15 Min., 150°) der Chromatogramme aber erscheinen diese Verbindungen als braune Flecke³, so daß ihr Nachweis auch dadurch gelingt.

Als Lösungsmittel für die Chromatographie der Säuren wurden Isoamylalkohol-konz. Ammoniak-Wasser (30:15:5; Gemisch A)¹⁴ und n-Butanol-Äthanol-konz. Ammoniak-Wasser (4:4:1:1; Gemisch B)³, für die mit Ninhydrin entwickelten Chromatogramme auch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5; Gemisch C) herangezogen. Der Nachweis der sauren Verbindungen am Papier erfolgte nach der schon öfter^{1, 3, 9, 14} gut bewährten Methode des Besprühens mit einer Lösung von 4-Methyl-umbelliferon als Fluoreszenzindikator, wobei unter der UV-Lampe die Substanzen als dunkle Flecke auf hellblau leuchtendem Grund erscheinen.

Experimenteller Teil.

Di-Cbzo-Lysyl-glycin-äthylester.

Di-Cbzo-Lysin-hydrazid wurde nach der Vorschrift von *Bergmann*¹⁵ für das D-Isomere dargestellt. Aus Äthanol Nadeln. Schmp. 156 bis 158¹⁶.

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_4$. Ber. N 13,07. Gef. N 13,28.

Die Diazotierung des Hydrazids und Kupplung des Azids mit Glycin-äthylester erfolgte nach *Brenner* und *Burckhardt*⁶. Ausbeute 60% d. Th. Aus Essigester-Petroläther amorph. Schmp. 70 bis 74°.

$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_3$. Ber. N 8,41, OC_2H_5 9,01. Gef. N 8,79, OC_2H_5 8,55.

Di-Cbzo-Lysyl-glycin.

0,3 g Di-Cbzo-Dipeptidester wurden in 3 ml Aceton gelöst, mit 0,6 ml (1 Mol) n NaOH versetzt und 4 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Nach

¹⁴ K. Schlögl und A. Siegel, Mikrochem. **40**, 202 (1953).

¹⁵ M. Bergmann, L. Zervas und J. P. Greenstein, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1692 (1932).

¹⁶ Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach *Kofler* bestimmt.

Abdampfen des Acetons im Vak. und Ansäuern mit n HCl fiel ein klebriger Niederschlag, der in Essigester aufgenommen wurde. Der Essigesterlösung wurde das Cbzo-Dipeptid mit Sodalösung entzogen und nach Fällen mit HCl erneut in Essigester aufgenommen. Beim Versetzen mit Petroläther fiel nach einigem Stehen ein amorpher Niederschlag. Ausbeute 0,2 g (70% d. Th.). Schmp. 135 bis 141°.

$C_{24}H_{29}O_7N_3$. Ber. Äqu.-Gew. 471. Gef. Äqu.-Gew. 476 (Tit.).

Carbonyl-(ε-Cbzo-lysin)-(glycin) (II, R₁ = H).

a) *Mit 3 Mol Alkali in der Kälte:* Wurden 0,2 g Di-Cbzo-Lys-Gly-ester in 1,2 ml Äthanol gelöst und mit 1,2 ml n NaOH 4 Stdn. bei Zimmertemp. behandelt, so erhielten wir nach dem Abdampfen des Alkohols, Ansäuern mit n HCl und anschließender Ätherextraktion (24 Stdn.) 0,1 g (66% d. Th.) eines Glases, das nach Behandeln mit Äthanol-Äther-Petroläther fest wurde. Aus Essigester-Petroläther mehrfach umgelöst, schmolz die amorphe Substanz von 128 bis 135°. Sie war papierchromatographisch einheitlich.

$C_{17}H_{23}O_7N_3$. Ber. N 10,99. Gef. N 10,98.

b) *Mit 2 Mol Alkali in der Wärme:* 1,5 g Cbzo-Dipeptidester lösten wir in 6 ml Äthanol, versetzten mit 6 ml n NaOH (2 Mol) und erwärmten die Lösung 2 Stdn. am Wasserbad. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgte wie unter a beschrieben. Ausbeute 0,8 g (70% d. Th.). Schmp. 140 bis 150°; nach mehrmaligem Umlösen aus Essigester-Äther 148 bis 154°.

$C_{17}H_{23}O_7N_3$. Ber. C 53,54, H 6,12, Äqu.-Gew. 190,6.
Gef. C 53,50, H 5,78, Äqu.-Gew. 195.

5-(δ-Phenylureido-n-butyl)-hydantoin-3-essigsäure (IV, R₁ = H).

0,6 g des nach a oder b erhaltenen Harnstoffes II ($R_1 = H$) wurden mit 10 ml HCl (1 : 1) 1 Std. zum Sieden erhitzt und dann die Lösung im Vak. abgedampft. Der Rückstand lieferte im Chromatogramm neben etwas Lys und Gly das Hydantoin III ($R_1 = H$) (vgl. Tabelle 1). Er wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit n NaOH auf pH 8 bis 9 gebracht und mit 0,4 g Phenylisocyanat in 2 Portionen unter Schütteln versetzt, wobei durch weitere Laugezugabe der pH aufrechterhalten wurde. Der gebildete Diphenylharnstoff wurde abzentrifugiert, die klare Lösung mit HCl angesäuert und 24 Stdn. mit Äther extrahiert. Schon aus dem Äther fielen 0,22 g (41% d. Th.) Niederschlag aus, der von 170 bis 173° schmolz. Aus Wasser. Schmp. 172 bis 175°.

$C_{16}H_{20}O_5N_4$. Ber. C 55,16, H 5,78, Äqu.-Gew. 348.
Gef. C 55,54, H 5,94, Äqu.-Gew. 348.

Die aus den kleinen Mengen Gly und Lys entstandenen Phenylisocyanatderivate waren wahrscheinlich durch das Umlösen entfernt worden.

ε-Cbzo-Lysin.

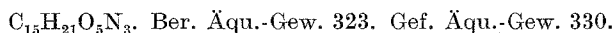
4,5 g Lysin-monohydrochlorid wurden in 50 ml Wasser gelöst, in der Hitze mit einem Überschuß von Cu-Carbonat versetzt, vom überschüssigen Cu-Carbonat abfiltriert und die klare blaue Lösung unter Eiskühlung und gutem Schütteln abwechselnd mit 8,4 g Benzylchlor-kohlensäureester (2 Mol) und Sodalösung behandelt. Der ausfallende blaue Cu-Komplex wurde abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser und nach dem Trocknen mit Äther

zur Entfernung von anhaftendem Cbzo-Chlorid gewaschen. Hierauf wurde er in wenig Wasser suspendiert, mit n HCl bis zur Lösung versetzt und unter Erwärmen H_2S eingeleitet. Das Filtrat vom CuS wurde zur Trockene abgedampft, in wenig Wasser gelöst und durch vorsichtiges Versetzen mit wäßr. Ammoniak das ϵ -Cbzo-Lys ausgefällt. Ausbeute 4,5 g (65% d. Th.). Aus Äthanol-Wasser Blättchen. Schmp. 231 bis 237° (Zers.).



α -Ureido- ϵ -(Cbzo-amino)- n -capronsäure (VII).

2,85 g ϵ -Cbzo-Lys lösten wir in 300 ml heißem Wasser teilweise auf, versetzten mit 1,25 g (1,5 Mol) KOCN und erhitzen die Lösung 15 Min. zum Sieden, wonach auch die letzten Reste von Cbzo-Lys in Lösung gegangen waren. Nach Kühlen wurde mit konz. HCl schwach angesäuert und der ausfallende Niederschlag nach guter Kühlung abgesaugt. Ausbeute 2,65 g (80% d. Th.). Aus Äthanol-Wasser Stäbchen. Schmp. 159 bis 161° (ger. Zers.).



5-[δ -(Cbzo-Amino)- n -butyl]-hydantoin (VIII).

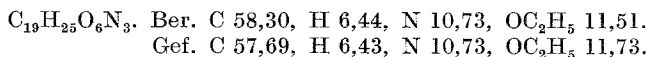
a) 0,1 g VII wurde mit 20 ml HCl (1 : 2) im Vak. eingedampft, hierauf noch einmal mit 5 ml HCl (1 : 2) im Vak. zur Trockene gebracht und der Rückstand aus Äthanol-Wasser umgelöst. 0,05 g (52% d. Th.). Nadeln, Schmp. 136 bis 138°.

b) Wurden 2,6 g VII mit 100 ml HCl (1 : 1) 30 Min. zum Sieden erhitzt und der Abdampfückstand in üblicher Weise mit Benzylchlorkohlensäure-ester und $NaHCO_3$ acyliert, so fiel 1 g (40% d. Th.) eines schmierigen Niederschlages aus, der nach 2maligem Umlösen aus Wasser von 135 bis 137° schmolz und keine Depression im Mischschmp. mit dem nach a erhaltenen Produkt gab. Trotz der schlechteren Ausbeute ist bei größeren Ansätzen Weg b vorzuziehen, da Methode a nur in kleinen Mengen befriedigende Resultate liefert.



5-[δ -(Cbzo-Amino)- n -butyl]-hydantoin-3-essigsäure-äthylester (IX).

0,055 g Na wurden in 5 ml absol. Äthanol gelöst, die Lösung mit 0,7 g VIII (1 Mol) 1 Std. erhitzt, die Suspension mit 0,4 g Bromessigsäureäthylester (1 Mol) in weiteren 5 ml Äthanol versetzt und die Mischung noch 5 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt. Schon nach einiger Zeit war die Lösung klar, während sich im weiteren Verlauf der Reaktion wieder ein feiner Niederschlag abschied. Der Abdampfückstand wurde in Wasser aufgenommen und der zäh-schmierige Rückstand durch Verreiben mit Äther zur Kristallisation gebracht. Ausbeute 0,65 g (73% d. Th.). Aus Äthanol-Äther Nadeln. Schmp. 120 bis 122°.



Carbonyl-(ϵ -Cbzo-lysine)-(glycine) (II, $R_1 = H$) aus IX.

Wurden 0,2 g IX in 1,5 ml Äthanol gelöst und mit 1,1 ml n NaOH (2 Mol) 2 Stdn. am Wasserbad erhitzt, so erhielt man nach der früher beschriebenen Aufarbeitung 0,15 g (77% d. Th.) eines sehr zähen Öles, das durch Behandeln

mit Essigester-Petroläther fest wurde. Schmp. 117 bis 123°. Der Schmp. war auch nach öfterem Umlösen unverändert. Papierchromatographisch war das Produkt mit dem aus Di-Cbzo-Lys-Gly-ester erhaltenen identisch.

$C_{17}H_{23}O_7N_3$. Ber. Äqu.-Gew. 190,6. Gef. Äqu.-Gew. 199.

*5-(δ -Phenylureido-*n*-butyl)-hydantoin-3-essigsäure (IV, $R_1 = H$).*

a) Aus obigem Harnstoff wurde das Phenylureidohydantoin nach Erhitzen mit Salzsäure durch Umsetzung des Rückstandes mit Phenylisocyanat — wie früher (S. 949) beschrieben — erhalten. Schmp. 168 bis 172°, keine Depression im Mischschmp. mit dem aus dem Dipeptid erhaltenen Produkt (S. 949).

$C_{16}H_{20}O_5N_4$. Ber. Äqu.-Gew. 348. Gef. Äqu.-Gew. 352.

b) Aus IX: Nach 3stündigem Kochen von IX mit HCl (1 : 1) und Umsetzung des Abdampfrückstandes, in dem das Vorliegen des freien Hydantoins III ($R_1 = H$) papierchromatographisch erwiesen wurde, mit Phenylisocyanat in der beschriebenen Weise konnte wieder das erwartete Phenylureidohydantoin gewonnen werden, das nach Schmp., Mischschmp. und R_F -Wert sowohl mit dem nach a, als auch mit dem aus dem Cbzo-Dipeptid-ester erhaltenen Produkt (S. 949) identisch war.

Di-Cbzo-Lysyl-glycyl-phenylalanin-äthylester.

2,3 g Di-Cbzo-Lysin-hydrazid wurden nach Brenner und Burckhardt⁶ diazotiert und die ätherische Lösung (50 ml) des Azids mit einer Lösung von 1,75 g (1,3 Mol) Gly-Phe-äthylester² in 50 ml absol. Essigester versetzt. Nach 3 Stdn. Stehen bei 0° und weiteren 12 Stdn. bei Raumtemp. wurde die Lösung mit n HCl, $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und im Vak. eingedampft. Es hinterblieben 2,3 g zähes Öl, das nach Lösen in Essigester und Versetzen mit Petroläther nach einiger Zeit im Eisschrank erstarrte. Ausbeute 2,0 g (59% d. Th.). Nach öfterem Umlösen aus Essigester-Petroläther schmolz der Cbzo-Tripeptidester von 70 bis 76° und lieferte nach 5stündiger Hydrolyse mit HCl (1 : 1) im Papierchromatogramm Lys, Gly und Phe.

$C_{35}H_{42}O_8N_4$. Ber. OC_2H_5 6,96. Gef. OC_2H_5 6,55.

Carbonyl-(ϵ -Cbzo-lysine)-(glycyl-phenylalanin) (IIa, $R_1 = H$, $R_2 = Benzyl$).

a) Durch Verseifen mit 1 Mol Lauge: 0,3 g Di-Cbzo-Tripeptidester lösten wir in 5 ml Aceton und schüttelten die Lösung mit 0,5 ml n NaOH (1,1 Mol) 4 Stdn. bei Zimmertemp. Nach Abdampfen des Acetons und Ansäuern mit n HCl wurde mit Äther 24 Stdn. extrahiert. Die Ätherlösung, aus der sich wenig Niederschlag abgeschieden hatte, wurde eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und mit 5%iger Sodalösung ausgeschüttelt. Nach deren Ansäuern und erneutem Aufnehmen des ausfallenden Öles in Essigester wurde die Essigesterlösung mit Petroläther versetzt und gekühlt. Nach einiger Zeit hatte sich ein amorpher Niederschlag abgeschieden, der 2mal aus Äthanol-Äther umgelöst wurde. Schmp. 163 bis 168°.

$C_{26}H_{32}O_8N_4$. Ber. C 59,08, H 6,10, N 10,60.

Gef. C 59,03, H 6,19, N 10,74.

b) Dieselbe Verbindung konnte in besserer Ausbeute (80% d. Th.) durch Erwärmen des Cbzo-Tripeptidesters mit 2 Mol äthanol. Lauge gewonnen werden. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter a beschrieben.

*5-(δ -Phenylureido-*n*-butyl)-hydantoin-3-essigsäure (IV, $R_1 = H$) aus Cbzo-Lys-CO-Gly-Phe.*

0,36 g des nach b erhaltenen Harnstoffes wurden mit 10 ml HCl (1:1) 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Der Abdampfrückstand zeigte im Papierchromatogramm neben viel Phe, wenig Lys und Gly noch das Hydantoin aus Lys und Gly III ($R_1 = H$). Nach Lösen in Wasser wurde der Rückstand bei pH 8 bis 9 mit Phenylisocyanat umgesetzt, vom Diphenylharnstoff abzentrifugiert und hierauf angesäuert. Vom Niederschlag (0,25 g), der im Chromatogramm neben viel Phenylureidohydantoin auch noch die Phenylisocyanatverbindung des Phenylalanins zeigte (Tabelle I), wurde abgesaugt und die Mutterlauge mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherrückstand (0,1 g) wurde mit dem erwähnten Niederschlag (0,25 g) vereinigt und mit 10 ml HCl (1:1) 30 Min. zum Sieden erhitzt. Den Abdampfrückstand nahmen wir in Essigester auf, schüttelten mit Sodalösung aus und extrahierten die Sodalösung nach dem Ansäuern erneut mit Äther. Dabei wurden 0,13 g (55% d. Th.) Rückstand erhalten, der nach Umlösen aus Wasser von 170 bis 174° schmolz und im Mischschmp. keine Depression mit den früher beschriebenen Phenylureidohydantoinen aus Gly und Lys (IV, $R_1 = H$) ergab.

Nach 5ständiger Hydrolyse mit konz. HCl bei 150° lagen im Chromatogramm nur Lys und Gly vor.

Di-Cbzo-Lysyl-valin-äthylester.

a) *Nach Methode A* (S. 940): Die Kupplung des Di-Cbzo-Lysyl-azids mit dem Valinester erfolgte wie beim Cbzo-Lys-Gly-Phe beschrieben, nur daß der Valinester (0,5 Mol Überschuß) in Äther gelöst wurde. Der Cbzo-Dipeptidester stellt ein zähes, ätherlösliches Öl dar, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ausbeute 60% d. Th.

b) *Nach Methode B*: 2,28 g Di-Cbzo-Lysin wurden in 10 ml absol. Tetrahydrofuran gelöst, mit 1,25 g (1 Mol) Tri-isoamyl-amin und nach Kühlen auf -10° mit 0,59 g (1 Mol) Äthylchlorkohlensäureester versetzt. Nach 10 Min. bei -10° wurden 0,95 g Valin-äthylester (1,2 Mol) in 5 ml absol. Tetrahydrofuran zugegeben, wobei CO_2 -Entwicklung zu beobachten war. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemp. wurde mit Äther verdünnt und mehrfach mit n HCl, Wasser, Sodalösung und wieder mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Lösungsmittels verblieben 1,85 g 62% d. Th.) gelbliches Öl von den unter a angegebenen Eigenschaften.

Nach 5ständigem Kochen mit HCl (1:1) zeigten beide Produkte (a und b) im Chromatogramm die im allgemeinen Teil näher besprochenen Hydantoinflecke (siehe auch Tabelle I).

Carbonyl-(ϵ -Cbzo-lysyl)-(valin) (II, $R_1 = Isopropyl$).

Die Umlagerung des Di-Cbzo-Lys-Val-esters erfolgte mit 2 Mol äthanol. NaOH in der Wärme. Aufarbeitung durch Abdampfen des Alkohols, Ansäuern und Ätherextraktion. Ausbeute 70% d. Th. eines nicht kristallisierenden zähen Öles. Saure Hydrolyse und Chromatographie gab wieder die schon früher erwähnten Flecke zwischen Lys und Val.

Phenylureido-hydantoin aus Lys und Val (IV, $R_1 = Isopropyl$ bzw. Reste vertauscht).

Die Darstellung war der des Phenylureidohydantoinen aus Lys und Gly analog (S. 949). Glasiges Öl, das nicht erstarrte, papierchromatographisch

einheitlich war (Tabelle 1) und bei Druckhydrolyse (HCl, 5 Stdn., 150°) Lys und Val gab.

Lysyl-valin.

Di-Cbzo-Lysyl-valin-benzylester wurde analog dem Äthylester nach Methode B durch Umsetzung von Di-Cbzo-Lysin und Val-benzylester in 60%iger Ausbeute gewonnen. Er stellt ein schwach gelbliches, sehr zähes Öl vor, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Zur Darstellung des freien *Dipeptides* wurden 0,50 g des Benzylesters in 20 ml Äthanol gelöst, mit 1,7 ml n HCl (2 Mol) versetzt und nach Zugabe von 0,5 g Pd-Tierkohle (5%ig) unter Wasserstoffdruck mehrere Stdn. geschüttelt. Der Abdampfrückstand der vom Katalysator abfiltrierten Lösung lieferte 0,25 g (95% d. Th.) hygroskopischen Rückstand.

N-[(α,ϵ -Diphenylureido)-n-capronyl]-valin.

0,25 g Dipeptid-chlorhydrat wurden in Wasser gelöst und bei pH 8 bis 9 in der üblichen Weise mit Phenylisocyanat (0,25 g) umgesetzt. Beim Ansäuern der vom Diphenylharnstoff durch Zentrifugieren befreiten Lösung fielen 0,20 g (51% d. Th.) amorpher Niederschlag aus, der 2mal aus Sodalösung mit HCl umgefällt wurde. Schmp. 110 bis 116°, Sintern ab 105°.

$C_{25}H_{33}O_5N_5$. Ber. Äqu.-Gew. 483,5. Gef. Äqu.-Gew. 483.

Ätherextraktion der Mutterlauge lieferte 0,09 g eines Öles, das sich im Chromatogramm als Phenylureido-hydantoin IV ($R_1 = \text{Isopropyl}$) erwies.

Cbzo-Valyl-phenylalanin-äthylester.

2,2 g Cbzo-Val, 2 g Tri-isoamyl-amin, 0,98 g Äthylchlorkohlensäureester und 1,9 g Phenylalanin-äthylester wurden, wie beim Di-Cbzo-Lys-Val-ester (Methode B) beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute 3,0 g (80% d. Th.) eines bald erstarrenden Öles, das sich aus Äthanol-Wasser umlösen ließ. Schmp. 128 bis 133°, Sintern ab 105°. Die Literatur, in der der Cbzo-DL-Val-DL-Phe-ester 2mal erwähnt ist, gibt als Schmp. 123¹⁷ bzw. 138 bis 140¹⁸ an.

Cbzo-Valyl-phenylalanin.

Verseifung des Esters mit 1 Mol äthanol. NaOH bei Raumtemp. lieferte nach üblicher Aufarbeitung (Abdampfen des Äthanol und Ansäuern mit HCl) das Cbzo-Dipeptid, das sich aus Äther-Petroläther umlösen ließ. Es schmolz unscharf von 138 bis 147° nach vorherigem Sintern.

$C_{22}H_{26}O_5N_2$. Ber. Äqu.-Gew. 398,5. Gef. Äqu.-Gew. 410.

Valyl-phenylalanin-äthylester.

0,85 g Cbzo-Dipeptidester wurden in 25 ml Äthanol, das 2 ml n HCl (1 Mol) enthielt, gelöst und mit 0,5 g 5%iger Pd-Tierkohle unter geringem Wasserstoffdruck mehrere Stdn. geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. verblieben 0,65 g Esterchlorhydrat, aus dem der Ester mit K_2CO_3 in Freiheit gesetzt und in Essigester aufgenommen wurde. Ausbeute 0,42 g (74% d. Th.) zähes Öl.

¹⁷ J. W. Davis, C. r. acad. sci., Paris 235, 180 (1952).

¹⁸ J. R. Vaughan und R. L. Osato, J. Amer. Chem. Soc. 74, 676 (1952).

Di-Cbzo-Lysyl-valyl-phenylalanin-äthylester.

0,66 g Di-Cbzo-Lys, 0,36 g Tri-isoamyl-amin, 0,17 g Äthylchlorkohlensäureester und 0,42 g Dipeptidester wurden in der beschriebenen Weise umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute 0,82 (79% d. Th.) eines Glases, das beim Umlösen aus Wasser und Alkohol erstarrte und dann unscharf von 110 bis 120° schmolz. 5stünd. Kochen mit HCl (1 : 1) und Chromatographie des Rückstandes gab Lys, Val und Phe.

$C_{38}H_{48}O_8N_4$. Ber. N 8,13, OC_2H_5 6,54. Gef. N 7,87, OC_2H_5 6,32.

Abbau des Lysyl-valyl-phenylalanins.

0,3 g Di-Cbzo-Tripeptidester wurden mit 2 Mol äthanol. NaOH in der Wärme umgelagert (2 Stdn.), das Carbonyl-aminosäure-peptid durch Ätherextraktion isoliert und 2 Stdn. mit HCl (1 : 1) erhitzt. Das Chromatogramm zeigte viel Phe neben wenig Lys und Val sowie das eine der beiden Hydantoine aus Lys und Val (siehe allg. Teil und Tabelle 1). Der Abdampfrückstand wurde in üblicher Weise mit Phenylisocyanat umgesetzt, das Filtrat vom Diphenylharnstoff mit konz. HCl im Überschuß versetzt, 30 Min. zum Sieden erhitzt und dem Abdampfrückstand, der in Essigester gelöst worden war, das gewünschte Phenylureido-hydantoin IV ($R_1 = \text{Isopropyl}$ bzw. Reste vertauscht) mit Sodalösung entzogen. Die Sodalösung wurde angesäuert, mit Äther erschöpfend im Apparat extrahiert, der Ätherrückstand chromatographiert, wobei er sich mit dem aus Lys-Val gewonnenen Phenylureido-hydantoin (S. 952) als identisch erwies, und die Substanz in der früher beschriebenen Weise³ vom Papier mit Äthanol eluiert, in einer Kapillare 5 Stdn. mit HCl bei 150° hydrolysiert und das Hydrolysat erneut chromatographiert: Es lagen nur Val und Lys vor.

Cbzo-Lysozym.

0,100 g Lysozym wurde in 3 ml Wasser suspendiert, mit einigen Tropfen 50%iger Essigsäure in Lösung gebracht, hierauf auf 0° gekühlt und mit 0,10 ml Cbzo-Chlorid versetzt. Nachdem der pH mit 2 n NaOH auf 8 bis 9 gebracht worden war, wurde unter Eiskühlung heftig geschüttelt, worauf bald Trübung und Ausfallen eines Niederschlages erfolgte. Nach 1/2 Std. wurde nochmals 0,10 ml Cbzo-Chlorid zugegeben, der pH wieder auf 8 bis 9 gebracht und weitere 4 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Es wurde zur Entfernung von überschüssigem Cbzo-Chlorid mehrfach mit Äther ausgeschüttelt, die wäßr. Schicht angesäuert, der dichte Niederschlag abgesaugt und gut mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Ausbeute 0,097 g eines in Essigsäure unlöslichen Pulvers.

Abbau von Cbzo-Lysozym.

50 mg Cbzo-Lysozym wurden mit 1 ml 0,3 n NaOH 1 1/2 Stdn. am Wasserbad erhitzt, wobei unter Gelbfärbung bald Lösung eintrat. Der Abdampf- rückstand wurde mit 5 ml HCl (1 : 1) zum Sieden erhitzt, nach 4 Stdn. die klare Lösung im Vak. zur Trockene gedampft, der Rückstand mehrfach mit Wasser abgedampft und schließlich in 1 ml Wasser gelöst. Endlich wurden 10 μ l dieser Lösung auf den Startpunkt eines Chromatogramms aufgebracht (wegen seiner größeren Dicke wurde hier Schleicher & Schüll 2043 b rauh verwendet) und mit Butanol-Eisessig-Wasser entwickelt. Das fragliche Hydantoin aus Lys und Val, dessen Lage aus einem Parallel-

chromatogramm (siehe Abb. 1) bekannt war, wurde ausgeschnitten, mit Wasser eluiert, 5 Stdn. in einer Kapillare mit HCl bei 150° hydrolysiert und das Hydrolysat wieder chromatographiert. Außer einem Fleck mit dem ungefähren R_F -Wert des Hydantoins (wahrscheinlich Ala, Pro) lagen noch 2 Flecke mit den R_F -Werten von Lys und Val vor, wie aus der Abb. 1 hervorgeht.

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

Für sein förderndes Interesse an unserer Arbeit sind wir dem Vorstand unseres Institutes, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, zu großem Dank verpflichtet.

Einer von uns (*K. S.*) dankt der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für die Gewährung einer Unterstützung aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung.