

Konstitutionsermittlung von Peptiden VII. Die gleichzeitige Bestimmung der amino- und carboxyl- endständigen Aminosäure mittels Hydrazins¹.

XII. Mitteilung über Peptide².

Von

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

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 22. März 1954.)

Bei der energischen Hydrazinbehandlung von N-Carbo-
benzoxypeptiden tritt Spaltung aller Peptidbindungen unter
Bildung von Aminosäure-hydraziden (III) ein, während die
carboxylendständige Aminosäure unverändert bleibt und aus
der aminoendständigen ein Dihydrazid (II) einer α -Amino-N-
carbonsäure gebildet wird. Diese Reaktion konnte zur gleich-
zeitigen Bestimmung der beiden an den Enden eines Peptides
vorliegenden Aminosäuren herangezogen werden, da sich, wie
schon früher gezeigt wurde^{3,4}, die Dihydrazide leicht in 3-Amino-
hydantoine (IV) überführen lassen, die dann von den Amino-
säuren und ihren Hydraziden glatt abtrennbar sind und an-
schließend papierchromatographisch getrennt und identifiziert
werden können.

Dieses Verfahren, das sich auch vorteilhaft mit einem früher
beschriebenen Peptidabbau⁵⁻⁹ kombinieren läßt, wurde sowohl
präparativ als auch im Mikromaßstab an 5 Dipeptiden, 5 Tri-
peptiden und dem krist. Enzym Lysozym erprobt.

¹ Vorläufige Mitteilung: K. Schlögl und E. Wawersich, Naturwiss. 41, 38 (1954).

² XI. Mittlg.: K. Schlögl und H. Fabitschowitz, Mh. Chem. 84, 937 (1953).

³ K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. 82, 799 (1951).

⁴ K. Schlögl, J. Derkosch und E. Wawersich, Mh. Chem. 85, 607 (1954).

⁵ F. Wessely, K. Schlögl und G. Korger, Mh. Chem. 83, 1156 (1952).

⁶ F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 83, 1426 (1952).

⁷ Dieselben, Mh. Chem. 83, 1439 (1952).

⁸ K. Schlögl, A. Siegel und F. Wessely, Z. physiol. Chem. 291, 265 (1952).

⁹ F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 84, 263 (1953).

1952 hatten *S. Akabori*, *Ko Ohno* und *K. Narita*¹⁰ ein Verfahren zur Bestimmung der carboxylendständigen Aminosäure (C-AS) in Peptiden angegeben, das darauf beruht, daß bei energischer Hydrazinbehandlung von Peptiden aus allen Aminosäuren bis auf die C-endständige, die unverändert bleibt, Aminosäure-hydrazide (III) gebildet werden. Werden dann diese Hydrazide mit Benzaldehyd als unlösliche Benzalverbindungen entfernt, so scheint in einem Papierchromatogramm nur mehr die C-AS auf. Kürzlich hat *K. Ohno*¹¹ die Methode dahingehend modifiziert, daß er das Reaktionsgemisch mit Dinitrofluorbenzol umsetzt und dabei aus den Hydraziden (III) Di-DNP-Verbindungen erhält, die als neutrale Substanzen von der aus der C-AS erhaltenen sauren DNP-Aminosäure abtrennbar sind. Das Verfahren hat sich auch bereits bei Proteinen bewährt und scheint allen übrigen chem. Methoden zur Bestimmung der C-AS, bei denen die freie COOH-Gruppe durch mehr oder weniger umständliche Reaktionen blockiert werden muß¹², überlegen zu sein.

Wir hatten anderseits 1951 die Beobachtung gemacht, daß bei der Hydrazinolyse von N-Cbzo-Aminosäure-estern Dihydrazide der Struktur II entstehen, die beim Erhitzen ihrer wäßr. Lösung unter Hydrazinabspaltung Ringschluß erleiden³. Die Konstitution der dabei erhaltenen Verbindungen wurde kürzlich⁴ einer eingehenderen Prüfung unterzogen. Aus den meisten Reaktionen ließ sich mit großer Wahrscheinlichkeit die Formulierung als Aminohydantoin (IV) ableiten. Solche Aminohydantoinen wurden bisher von 10 α -Aminosäuren dargestellt^{3,4}.

Diese Umsetzung schien uns, vor allem da sie auch auf N-Cbzo-Peptide übertragbar war, sehr zur Abspaltung der aminoendständigen Aminosäure (N-AS) eines Peptides geeignet und mußte es zusammen mit dem eingangs erwähnten Verfahren ermöglichen, in einem Peptid in einem einfachen Arbeitsgang beide an den Enden befindlichen Aminosäuren, also die N- und die C-AS, zu ermitteln.

In Kombination mit der früher beschriebenen Möglichkeit⁵⁻⁹ zur Abspaltung der N-AS und der ihr benachbarten als substituierte Hydantoin-3-essigsäure, bei der sich aber die Reihenfolge der beiden am Aminoende des Peptides befindlichen Aminosäuren nur in wenigen Fällen feststellen ließ⁷, ist es jetzt möglich, die Lage von drei Aminosäuren im Peptidverband festzulegen, woraus sich bei niederen Peptiden meist schon die volle Aminosäuresequenz ergibt.

Im folgenden Schema ist die gleichzeitige Bestimmung der N-AS und der C-AS in einem Tripeptid mittels Hydrazins formelmäßig dargestellt. An Hand dieses Abbauschemas sollen die einzelnen Stufen und die sich daraus ergebenden Probleme und experimentellen Tatsachen etwas näher besprochen werden.

¹⁰ Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 214 (1952).

¹¹ J. Biochem. (Japan) **40**, 621 (1953).

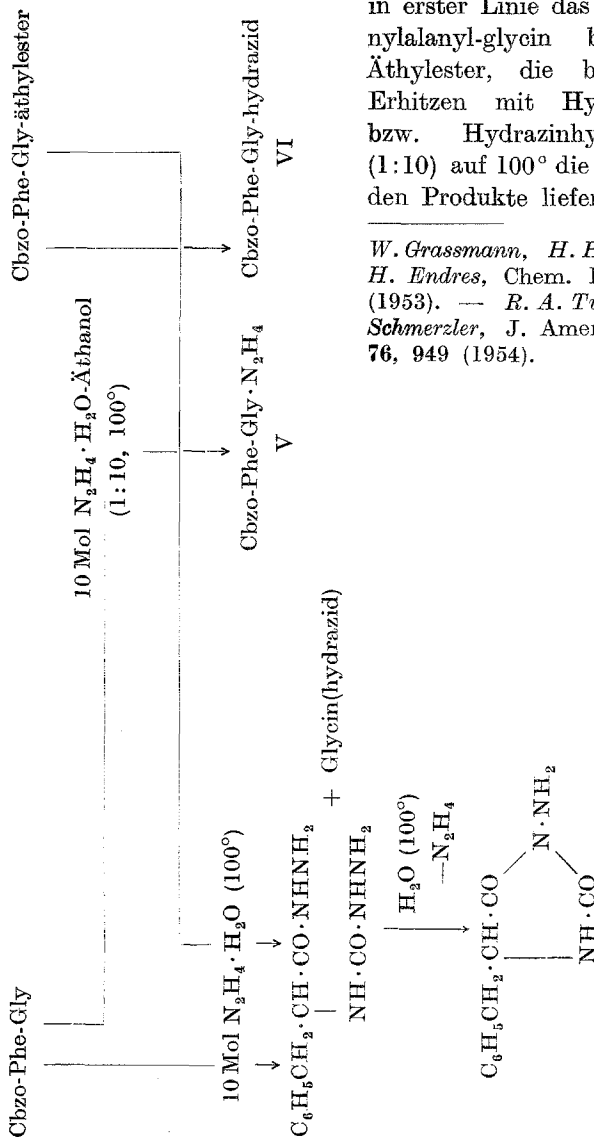
¹² *K. Schlögl*, Österr. Chem.-Ztg. **54**, 8 (1953). — *R. A. Boissonas*, Helv. Chim. Acta **35**, 2226 (1952). — *J. L. Bailey*, Biochem. J. **52**, IV (1952). — *G. W. Kenner*, *H. G. Khorana* und *R. J. Stedman*, J. Chem. Soc. London **1953**, 673. — *Th. Wieland* und *H. Fritz*, Chem. Ber. **86**, 1186 (1953). —

1. Hydrazinolyse.

Wird ein Cbzo-Peptid (I) mit Hydrazin(hydrat) erhitzt, so tritt, wie schon erwähnt, Spaltung der Peptidbindungen unter Bildung von Aminosäurehydraziden (III) und des Dihydrzides (II) ein, während die C-AS weitgehend unverändert bleibt. Da also die Hydrazinspaltung die Schlüsselreaktion des Abbaues vorstellt, schien es vor allem wesentlich, die optimalen Spaltungsbedingungen festzustellen. Dazu wählten wir

in erster Linie das N-Cbzo-Phenylalanyl-glycin bzw. dessen Äthylester, die beim 5stünd. Erhitzen mit Hydrazinhydrat bzw. Hydrazinhydrat-Äthanol (1:10) auf 100° die nebenstehenden Produkte lieferten.

W. Grassmann, H. Hörmann und H. Endres, Chem. Ber. 86, 1477 (1953). — R. A. Turner und G. Schmerzler, J. Amer. Chem. Soc. 76, 949 (1954).



Das Hydrazinsalz des Cbzo-Phe-Gly (V) und das Cbzo-Phe-Gly-hydrazid (VI) wurden aus dem Cbzo-Peptid bzw. seinem Ester auch durch Umsatz mit geringem Hydrazinüberschuß bei Zimmertemp. erhalten. Bemerkenswert ist, daß die Behandlung mit dem Äthanol-Hydrazin-Gemisch beim Cbzo-Peptid noch nicht zur Sprengung der Peptidbindung geführt und auch die Cbzo-Gruppe noch unversehrt gelassen hatte, während Umsetzung der Cbzo-Aminosäureester unter gleichen Bedingungen bereits unter Eliminierung der Cbzo-Gruppe zur Bildung der Dihydrazide (II) führt⁸.

Nachdem auf diese Weise präparativ auch aus Cbzo-Peptiden die Bildung von Dihydraziden bewiesen war, aus denen dann durch Wasserverkochung die Aminohydantoine erhalten werden können, sollten die folgenden papierchromatographischen Untersuchungen eines mit Hydrazin unter verschiedenen Bedingungen behandelten Dipeptides die optimalen Bedingungen zur völligen Sprengung der Peptidbindung aufzeigen. Dafür wählten wir das Peptid Glycyl-Phenylalanin, das auf vier verschiedene Arten (100° bzw. Kochen mit Hydrazinhydrat bzw. wasserfreiem Hydrazin) der Hydrazinolyse unterworfen wurde. Nach den in der Tabelle 1 angegebenen Zeiten wurden gleiche Mengen papierchromatographiert, mit Ninhydrin auf noch vorhandenes Peptid bzw. abgespaltene C-Aminosäure und mit ammoniakal. AgNO₃-Lösung auf Hydrazide in getrennten Chromatogrammen geprüft. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

Es traten dabei, wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, nach einiger Zeit auch steigende Mengen von Phenylalanin-hydrazid auf, was auf die Umsetzung der freien COOH-Gruppe des Peptides zum Hydrazid schließen ließ. Da aber einerseits mit der Möglichkeit der Bildung des Diketopiperazins zu rechnen war, das dann auch Hydrazinolyse zum Phenylalanin-hydrazid erleiden konnte, andererseits aber die japanischen Autoren angegeben hatten¹⁰, daß z. B. beim Gly-Leu auch nach 10stünd. Kochen mit wasserfreiem Hydrazin noch keine Umsetzung der COOH-Gruppe eingetreten sein sollte, behandelten wir auch Phenylalanin unter denselben Bedingungen wie das Peptid mit Hydrazin. Wie aus den Ergebnissen, die ebenfalls in Tabelle 1 enthalten sind, eindeutig hervorgeht, treten bei zunehmender Dauer steigende Mengen von Phe-Hydrazid auf und es ist somit nicht anzunehmen, daß Gly-Leu noch nach 10 Stdn. völlig unverändert vorliegen sollte. Überdies stellte auch *Ohno* kürzlich fest¹¹, daß Leucin nach 10stünd. Hydrazinolyse nur mehr zu 66% wiedergzugewinnen war. Auch dieses Ergebnis läßt sich nach obigen Befunden ohne weiteres durch partielle Umsetzung zum Leucin-hydrazid interpretieren.

Nach all dem wählten wir als optimale Bedingungen für den Abbau von N-Cbzo-Peptiden 4- bis 6stünd. Erhitzen mit Hydrazinhydrat (bzw. wasserfreiem Hydrazin) im siedenden Wasserbad.

Tabelle 1. Hydrazinolyse von Gly-Phe und Phe mit Hydrazinhydrat bzw. wasserfreiem Hydrazin [in () unter verschiedenen Bedingungen. Papierchromatographie absteigend auf SS 2043a, Lösungsmittel: n-Butanol-Äthanol-NH₃-H₂O (4:4:1:1). *R_F*-Werte: Gly-Phe (0,32), Phe (0,45), Gly-hydrazid (0,17) und Phe-hydrazid (0,63). Die ungefähre Stärke der Flecken ist durch — nichts, + wenig, ++ stark, +++ sehr stark wiedergegeben.

Zeit in Stdn.	bei 100°									
	Glycyl-phenylalanin					Kochen				
	Gly-Phe	Phe	Gly-hydr.	Phe-hydr.	Phe	Gly-Phe	Phe	Gly-hydr.	Phe-hydr.	Phe
0,5	++ (+++)	+	+	—	+	+	+	+	—	—
1	++ (+)	+	+	—	+	+	+	+	—	+
2	++ (+)	++	++	—	—	—	+	+	+	+
5	++ (+)	++	++	—	—	—	+	+	+	+
9	— (—)	++	++	—	—	—	+	+	+	+
24	— (—)	++	++	—	—	—	+	+	+	+

2. Bestimmung der carboxylendständigen Aminosäure (C-AS).

Diese Bestimmung erfolgt im allgemeinen nach den Angaben der jap. Autoren¹⁰. Es werden also in einem Teil des mit Hydrazin erhaltenen Reaktionsproduktes nach Entfernung von überschüssigem Hydrazin durch Umsetzung mit Benzaldehyd oder Kochen mit Aceton die vorliegenden Hydrazide und Dihydrazide blockiert und in der erhaltenen Lösung kann nach Entfernung der unlöslichen Dibenzalverbindungen (die bei Umsatz in alkalischem Medium entstehen) die C-AS papierchromatographisch ermittelt werden. Auch die Umsetzung mit DNFB nach *Ohno*¹¹ läßt sich zur Abtrennung der Hydrazide und Dihydrazide heranziehen. Bei einfacheren Peptiden wird aber zweckmäßig das Reaktionsgemisch ohne vorherige Umsetzung direkt papierchromatographisch auf die C-AS geprüft, da ja die freien Aminosäuren infolge ihrer wesentlich stärkeren Farbreaktion mit Ninhydrin von den Hydraziden leicht unterschieden werden können.

3. Bestimmung der aminoendständigen Aminosäure (N-AS).

Nachdem nun in einem Teil des hydrazinbehandelten Cbzo-Peptides die C-AS bestimmt ist, wird der Rest in Wasser gelöst und die wäßr. Lösung 10 bis 20 Min. zum Sieden erhitzt, wobei das vorliegende Dihydrazid, das aus der N-AS stammt, Ringschluß zum 3-Amino-hydantoin (IV) erleidet. Dieses bildet mit Säuren kein Salz^{3,4} und kann daher aus der angesäuerten Lösung glatt mit Äther extrahiert und somit von den unverändert gebliebenen Aminosäure-hydraziden (III) und der C-AS abgetrennt werden.

Als letzter Schritt bleibt also nur mehr die Identifizierung der Aminohydantoine und damit die Bestimmung der N-AS, die zweifach ausgeführt werden kann:

a) Es können die extrahierten Aminohydantoine mit HCl unter energiereichen Bedingungen (140°, 4 bis 5 Stdn.) hydrolysiert und die dabei in Freiheit gesetzten, ihnen zugrunde liegenden Aminosäuren papierchromatographisch identifiziert werden. Aus allen in der Tabelle 2 angeführten Hydantoinen (IV) erhält man bei dieser Hydrolyse ausschließlich die entsprechenden Aminosäuren.

b) Es lassen sich die Aminohydantoine als solche am Papier mit Ammoniak enthaltenden Lösungsmittelgemischen befriedigend trennen. Die R_F -Werte sind in der Tabelle 2 angeführt.

Der Nachweis kann in sehr empfindlicher Weise durch Besprühen mit 0,1 n NaOH, Trocknen im Trockenschrank bei 50 bis 70° (etwa 10 Min.) und erneutes Besprühen mit ammoniakal. Silbernitratlösung (zirka 0,1 n) erfolgen, worauf die Aminohydantoine nach gelindem Erwärmen in Mengen bis etwa 3 µg (Ala-Derivat) bzw. 5 µg (Phe-Derivat) noch deutlich sichtbar sind. Nur das ε-Cbzo-Lys-Derivat ist erst in etwas größerer Menge (15 bis

20 μg) nachzuweisen. Anschließend können die Chromatogramme dann durch Waschen mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung und Wasser haltbar gemacht werden.

Der Nachweis der Aminohydantoinen beruht darauf, daß bei der Behandlung mit Lauge sehr leicht Ringöffnung zu den Hydrazidsäuren (VII) eintritt⁴, die zum Unterschied von den Hydantoinen (IV) ammoniakal. AgNO_3 -Lösung glatt reduzieren.

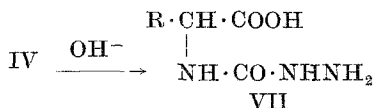


Tabelle 2. R_F -Werte der Aminohydantoinen (IV). Papier: Schleicher-Schüll 2043a. Absteigend. Lösungsmittel A: n-Butanol - Äthanol - konz. NH_3 - H_2O (4:4:1:1), B: Isoamylalkohol - konz. NH_3 - H_2O (6:3:1).

Aminohydantoin von ^{8, 4}	Lösungsmittel	
	A	B
Glutaminsäure	0,10	0,00
Alanin	0,43	0,11
C-Phenyl-glycin	0,50	0,20
Tyrosin	0,52	0,17
Methionin	0,65	0,35
Tryptophan	0,65	0,50
Valin	0,68	0,45
Phenylalanin	0,71	0,54
Leucin	0,75	0,69
ϵ -Cbzo-Lysin	0,79	0,73

Am besten zur Identifizierung der N-AS hat sich jedoch eine Kombination der beiden erwähnten Nachweismöglichkeiten bewährt: Dazu werden die extrahierten Aminohydantoinen primär am Papier chromatographiert, dadurch völlig rein erhalten, dann aus einem Parallelschichtchromatogramm — ähnlich wie früher für

Hydantoin-3-essigsäuren beschrieben⁸ — eluiert, in Kapillaren mit HCl hydrolysiert und erneut, diesmal als Aminosäuren, chromatographiert. Damit ist eine doppelte und daher weit-

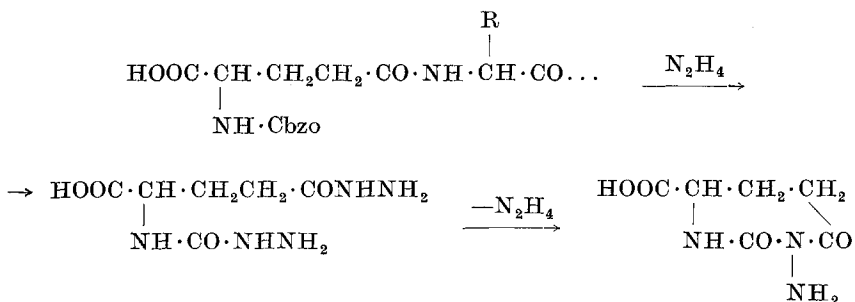
gehend sichere Identifizierung der N-AS gegeben. Überdies läßt sich dadurch der Substanzbedarf, da es sich ja auch bei allen Stufen um sehr leicht auszuführende Reaktionen handelt, auf ein Minimum beschränken und man kann daher mit kleinen Peptidmengen das Auslangen finden. So konnten wir z. B. den Abbau von Cbzo-Phe-Gly noch mit 5 mg ohne Schwierigkeiten ausführen, ohne daß diese Menge jedoch eine untere Grenze darstellt.

4. Grenzen der Methode.

Bei der Bestimmung von allen in der Tabelle 2 angeführten Aminosäuren am Aminoende eines Peptides treten keine Schwierigkeiten auf. Wie früher gezeigt⁴, ist ja z. B. die ϵ -Cbzo-Gruppe des Lysins gegen Hydrazin weitgehend stabil und es fällt daher das Aminohydantoin-Derivat des Lysins mit dem Rest $\text{R} = \text{Cbzo} \cdot \text{NH} \cdot (\text{CH}_2)_4 -$ an, wodurch sich Lysylpeptide glatt bestimmen lassen.

In α -Glutamylpeptiden wird die freie γ -COOH-Gruppe der Glutamin-

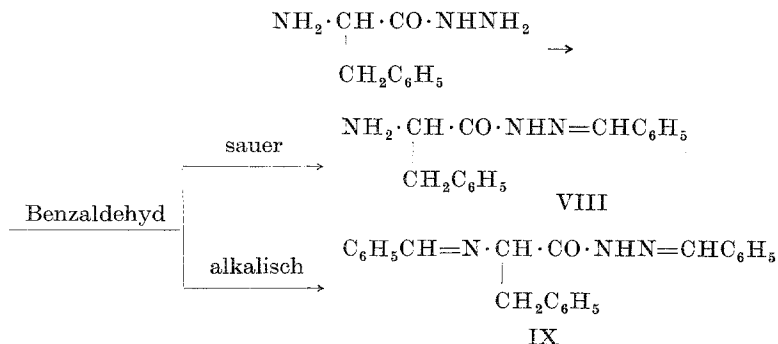
säure weitgehend in das Hydrazid übergeführt⁴ und liegt dann in nicht extrahierbarer Form vor. Dennoch bleibt noch so viel von der Carboxylgruppe unverändert, daß auch Glutaminsäure am Aminoende ohne wesentliche Schwierigkeiten bestimmbar ist. Bei γ -Glutamylpeptiden hingegen versagt die Methode analog wie beim Hydantoin-3-essigsäure-Verfahren⁹, da sich ja auch hier wieder beim Ringschluß der Dihydrazide ein 7er Ring ausbilden müßte.



Von den bisher untersuchten Aminosäuren treten jedoch Komplikationen beim Glycin, Serin und Cystin (Cystein) auf, sofern sie am Aminoende vorliegen. Die Dihydrazide des Glycins und Serins (II, $R_1 = \text{H}$ bzw. CH_2OH) geben nämlich beim Erhitzen der wäßr. Lösung keinen Ringschluß^{3,4} und daher keine ätherextrahierbare Substanz mehr. Im Fall von Glycylpeptiden kann diese Schwierigkeit, wenn auch etwas umständlich, auf folgende Weise umgangen werden: Nach Hydrazinbehandlung des Cbzo-Peptides wird das Gemisch aus dem Dihydrazid der Glycin-N-carbonsäure (II, $R_1 = \text{H}$) und den Aminosäurehydraziden (III) mit Benzaldehyd in saurer Lösung umgesetzt, wobei aus den Dihydraziden (III) nur die Monobenzalverbindungen [zum Unterschied vom alkalischen Medium, wo die Dibenzalverbindungen entstehen, wie wir beim Phenylalaninhydrazid zeigen konnten (VIII, IX)], aus dem Glycin-dihydrazid aber die Dibenzalverbindung³ entsteht. Diese kann aus saurer Lösung von den Monobenzalverbindungen, die noch eine freie Aminogruppe besitzen, abgetrennt werden und liefert nach energischer Hydrolyse die endständige Aminosäure Glycin.

Beim Serin aber versagte diese Modifikation, da die Dibenzalverbindung des Serin-dihydrazides (II, $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$) nach Hydrolyse keinen Fleck im Papierchromatogramm mehr ergab. Serin selbst lag nach HCl-Behandlung unter analogen Bedingungen (140° , 5 Stdn.) zum größten Teil als Alanin vor¹³.

¹³ K. Heyns und W. Walter, Naturwiss. **39**, 507 (1952); Z. physiol. Chem. **294**, 111 (1954). — V. M. Ingram, J. Chem. Soc. London **1953**, 3717.



Beim Cystin endlich traten *die* Schwierigkeiten auf, die schon in der früheren Mitteilung⁴ eingehender besprochen wurden. Da aus dem Di-Cbzo-Cystin-dimethylester weder nach direkter energischer Hydrazinbehandlung und nachfolgender Wasserverkochung, noch nach vorhergehender Oxydation mit Perameisensäure zum Cysteinsäurederivat definierte extrahierbare Produkte erhalten werden konnten, versagt die Methode also bei Peptiden mit Cystin als N-AS.

Nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen kann also aus dem Fehlen eines ätherextrahierbaren Aminohydantoins nach normalem Abbau auf das Vorliegen von Glycin, Serin oder Cystin am Aminoende geschlossen werden.

Das Verfahren zur Bestimmung der amino- und carboxylendständigen Aminosäuren wurde in der beschriebenen Form an den Peptiden¹⁴: Phe-Gly, Gly-Tyr, Ala-Gly, Glu-Gly, Val-Gly-Gly, Ala-Leu-Gly und Gly-Ala-Gly im präparativen Maßstab unter Identifizierung der aus den N-AS erhaltenen Aminohydantoine (Mischschmp.) und an den Peptiden Phe-Gly, Lys-Val, Glu-Gly, Leu-Gly-Gly und Leu-Gly-Phe im Mikromaßstab erprobt und lieferte in allen Fällen eindeutige Ergebnisse.

Daß diese Methode prinzipiell nicht nur auf niedrige Peptide beschränkt ist, konnten wir im Fall des krist. Enzyms Lysozym vom Molgewicht 14900 zeigen, bei dem wir in Übereinstimmung mit den von anderen Autoren erhobenen Befunden als N-AS Lysin¹⁵ und als C-AS Leucin^{11,16} fanden.

5. Kombination mit dem Hydantoin-3-essigsäure-Abbau.

Wie eingangs schon erwähnt, kann das vorliegende Verfahren mit einer früher beschriebenen Methode zum Peptidabbau^{5-9,2}, die ebenfalls

¹⁴ Für die Überlassung von Peptiden sind wir Herrn Prof. Dr. F. Mietzsch, Bayerwerke Elberfeld, und der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, zu großem Dank verpflichtet.

¹⁵ W. A. Schröder, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5118 (1952).

¹⁶ A. R. Thompson, Nature 169, 495 (1952).

ihren Ausgang von den N-Carbalkoxy(Carbobenzoxy-)peptiden nimmt, kombiniert werden und liefert in dieser Form Aufschluß über die Lage von drei Aminosäuren im Peptidverband. Die Abspaltung von 2 Aminosäuren vom Aminoende als substituierte Hydantoin-3-essigsäure, die dem erwähnten Abbau zugrunde liegt, ermöglichte bis jetzt nur in bestimmten Fällen die Ermittlung der Reihenfolge dieser beiden Aminosäuren⁷ und manchmal mit NaBH_4 auch die Bestimmung der C-AS⁶. Durch den Hydrazinabbau werden nun diese Schwierigkeiten behoben, und auch in Bezug auf andere Komplikationen ergänzen sich die beiden Methoden sehr gut. Lysylpeptide, die z. B. beim Hydantoin-3-essigsäure-Abbau einige Schwierigkeiten verursachen², lassen sich — wie erwähnt — mit Hydrazin glatt bestimmen, und Glycylpeptide, bei denen Gly als N-AS mit Hydrazin nur schwer gefunden werden kann, bieten beim andern Abbau keinerlei Schwierigkeiten.

So ergibt sich also aus der Kenntnis von 3 Aminosäuren im Peptidverband, und zwar der N-AS, der ihr benachbarten und der C-AS im Fall eines Tetrapeptides sofort die eindeutige Konstitution, während etwa die Möglichkeiten der Aminosäuresequenzen in einem aus fünf verschiedenen Aminosäuren aufgebauten Pentapeptid von 120 auf nur mehr 2 eingeschränkt werden.

Experimenteller Teil.

N-Cbzo-DL-Phenylalanyl-glycin-äthylester.

9 g N-Cbzo-DL-Phenylalanin wurden in 35 ml absol. Tetrahydrofuran gelöst, mit 6,8 g Tri-isoamylamin (1 Mol) versetzt und zur gekühlten Lösung (-10°) 3,2 g (1 Mol) Chlorkohlensäure-äthylester zugefügt. Nach 10 Min. wurde eine Lösung von 3,1 g Glycin-äthylester (1 Mol) in 10 ml absol. Tetrahydrofuran zutropft, wobei starke CO_2 -Entwicklung zu beobachten war. Nach 12stünd. Stehen bei Zimmertemp. wurde von wenig Ungelöstem filtriert, mit 100 ml Wasser verdünnt, mit HCl angesäuert und mehrfach mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterauszüge lieferten nach Waschen mit 1 n HCl, H_2O , Sodalösung und Wasser beim Eindampfen im Vak. einen öligen Rückstand, der zwei Schichten bildete. Die obere dünnflüssige wurde abgossen (1,9 g) und konnte als Tri-isoamylamin identifiziert werden, während die untere Schicht (11,6 g) beim Verreiben mit Äther erstarrte. Ausbeute: 10 g (87% d. Th.) vom Schmp. 97 bis 101^{17} . Zur Analyse wurde aus wenig Äthanol umkristallisiert. Nadeln, Schmp. 101 bis 103° .

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_2$. Ber. N 7,29. Gef. N 7,18.

N-Cbzo-DL-Phenylalanyl-glycin.

Zur Verseifung wurden 3,8 g Äthylester in 40 ml Äthanol gelöst, mit 10 ml 1 n NaOH (1 Mol) versetzt und 2 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen.

¹⁷ Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt.

Hierauf wurde der Alkohol im Vak. abgedampft und der wäßr. Rückstand angesäuert. Es fiel ein Öl aus, das bald erstarrte und sich aus Äthanol umkrist. ließ. Ausbeute: 3,2 g (90% d. Th.). Schmp. 157 bis 159°. (Die Literatur¹⁸ gibt 158 bis 159° an.)

$C_{19}H_{20}O_5N_2$. Ber. Äqu.-Gew. 356,4. Gef. Äqu.-Gew. 360 (Tit.).

Hydrazinsalz des Cbzo-Phe-Gly (V).

Wurde Cbzo-Phe-Gly (0,2 g) in 0,2 ml Hydrazinhydrat gelöst und nach 2stünd. Stehen bei Zimmertemp. im Vak. über H_2SO_4 das Hydrazin abgedampft, so konnten durch Umlösen aus absol. Äthanol 0,2 g Hydrazinsalz vom Schmp. 86 bis 105° gewonnen werden. Der Schmp. ist stark von der Anheizgeschwindigkeit abhängig und liegt bei langsamem Anwärmen bei 101 bis 105°.

$C_{19}H_{20}O_5N_2 \cdot N_2H_4$. Ber. N 14,43. Gef. N 12,77.
 $(C_{19}H_{20}O_5N_2)_2N_2H_4$. Ber. N 11,28.

Beim Lösen in Wasser und Ansäuern der Lösung lieferte das Hydrazinsalz wieder N-Cbzo-Phe-Gly.

N-Cbzo-DL-Phenylalanyl-glycin-hydrazid (VI).

0,16 g Cbzo-Phe-Gly-äthylester wurden in 2 ml absol. Äthanol gelöst, mit 0,1 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Zimmertemp. aufbewahrt. Nach dem Eindampfen im Vak. wurde der Rückstand 3mal aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 158 bis 161°.

$C_{15}H_{22}O_4N_4$. Ber. C 61,60, H 5,98. Gef. C 61,45, H 5,95.

Cbzo-Phe-Gly(-äthylester) + Hydrazinhydrat (bei 100°).

0,5 g des Cbzo-Peptides bzw. des Esters wurden in 0,7 ml Hydrazinhydrat (10 Mol) gelöst und 5 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Hierauf wurde das überschüssige Hydrazin im Vak. abgedampft und der Rest im Exsikkator über H_2SO_4 so weit als möglich entfernt.

a) *Cbzo-Phe-Gly*: Die Hälfte des Rückstandes wurde mit überschüssigem Aceton 3 Stdn. gekocht, ein Teil davon papierchromatographiert, wobei nur Glycin nachzuweisen war, und der Rest mehrfach aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 192 bis 194°. Mischschmp. mit der Di-isopropylidenverb.³ des Phenylalanin-N-carbonsäure-dihydrazids (II, $R_1 = \text{Benzyl}$): 192 bis 194°.

Den Rest des Hydrazinrückstandes erhitzen wir mit 5 ml Wasser 10 Min. zum Sieden und extrahierten anschließend die angesäuerte Lösung mit Äther im Apparat. Ausbeute: 0,095 g (66% d. Th.) vom Schmp. 185 bis 200°. Nach 2maligem Umkristallisieren aus Äthanol lag der Schmp. bei 205 bis 206°. Im Mischschmp. mit dem Aminohydantoin des Phenylalanins (IV, $R_1 = \text{Benzyl}$) ergab sich keine Depression.

b) *Cbzo-Phe-Gly-ester*: Hier wurde der ganze Hydrazinrückstand mit Wasser verköcht und die Aufarbeitung wie unter a) angegeben durchgeführt. Es wurden 0,17 g (64% d. Th.) 5-Benzyl-3-amino-hydantoin vom Schmp. 203 bis 205° erhalten, das nach Hydrolyse mit HCl (5 Stdn., 140°) im Papierchromatogramm ausschließlich Phenylalanin ergab.

¹⁸ F. W. Dunn und K. Dittmer, J. Biol. Chem. 188, 263 (1951).

Cbzo-Phe-Gly(äthylester) + Äthanol-Hydrazinhydrat (bei 100°).

0,5 g Cbzo-Peptid bzw. Cbzo-Peptid-äthylester wurden in 7 ml absol. Äthanol gelöst, mit 0,7 ml Hydrazinhydrat (10 Mol) versetzt und 5 Stdn. am siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdampfen des Äthanol und Hydrazins im Vak. wurde das restliche Hydrazin weitgehend im Schwefelsäure-Exsikkator entfernt.

a) *Cbzo-Phe-Gly*: In diesem Fall erhielten wir aus dem Rückstand durch Umkristallisieren aus Äthanol 0,3 g Hydrazinsalz, das beim langsamen Anheizen von 99 bis 104° schmolz, nach Hydrolyse im Papierchromatogramm Phenylalanin und Glycin zeigte und bei der Behandlung mit verd. Säure wieder Cbzo-Phe-Gly vom Schmp. 156 bis 158° lieferte.

b) *Cbzo-Phe-Gly-äthylester*: Aus dem Ester ließen sich 0,25 g Cbzo-Phe-Gly-hydrazid gewinnen, das mit dem oben beschriebenen Produkt (VI) keine Depression im Mischschmp. zeigte.

Darstellung der N-Cbzo-Peptide.

Die für den Hydrazinabbau notwendigen Cbzo-Peptide wurden auf übliche Weise durch Acylieren ihrer Na-Salze (1 n NaOH) bei 0° mit 1,2 Mol Benzylchlorkohlensäureester und 1 n NaOH dargestellt. Hierauf wurde zur Entfernung von überschüssigem Benzylchlorkohlensäureester mit Äther ausgeschüttelt und mit HCl das Cbzo-Peptid gefällt, bzw. wenn es sich um leichter lösliche Verbindungen handelte, nach dem Ansäuern durch Ausschütteln mit Essigester gewonnen.

Cbzo-DL-Val-Gly-Gly: aus Methanol-Wasser, Schmp. 180 bis 182°, $C_{17}H_{23}O_6N_3$. Äqu.-Gew. ber. 365, gef. 375.

Cbzo-DL-Ala-DL-Leu-Gly: aus Äthanol, Schmp. 197 bis 199°, $C_{19}H_{27}O_6N_3$. Äqu.-Gew. ber. 393, gef. 395.

Cbzo-Gly-DL-Ala-Gly: aus Äthanol-Äther, Schmp. 150 bis 152°¹⁹, $C_{15}H_{19}O_6N_3$. Äqu.-Gew. ber. 337, gef. 341.

Abbau im präparativen Maßstab.

Als Beispiel sei der Abbau von DL-Ala-DL-Leu-Gly etwas näher ausgeführt:

0,2 g Cbzo-Ala-Leu-Gly wurden mit 0,5 ml Hydrazinhydrat 6 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt, das Hydrazin anschließend im Vakuum-exsikkator über H_2SO_4 abgedampft und der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst.

Bestimmung der C-AS: 1 ml der wäßr. Lösung wurde mit 1 Tropfen Benzaldehyd geschüttelt und nach 10 Min. die Suspension zur Entfernung von überschüssigem Benzaldehyd mit Äther ausgeschüttelt. Es wurde filtriert und das Filtrat papierchromatographiert: Nur *Glycin*.

In einem andern Fall wurde wenig des vom überschüssigen Hydrazin befreiten Reaktionsproduktes mit 2 ml Aceton 1 Std. gekocht, der Abdampfrückstand in wenig Wasser aufgenommen und wieder chromatographiert. Auch hier war nur *Glycin* vorhanden.

Bestimmung der N-AS: Die restlichen 9 ml der wäßr. Lösung wurden 20 Min. in einem offenen Kölbchen zum Sieden erhitzt, anschließend mit HCl angesäuert, 24 Stdn. mit Äther extrahiert und der Rückstand (0,025 g) bei 0,01 Torr und 140 bis 150° im Kugelrohr destilliert. Nach Umkristallisieren

¹⁹ Lit. Schmp.: 145° [*Th. Wieland und R. Sehring*, Ann. Chem. 569, 122 (1950)].

aus Äthanol-Äther schmolz das Aminohydantoin von 134 bis 136° und zeigte keine Depression im Mischschmp. mit dem 5-Methyl-3-amino-hydantoin (IV, $R_1 = \text{CH}_3$). Nach Hydrolyse mit HCl bei 140° (5 Stdn.) lag im Papierchromatogramm nur *Alanin* vor.

In analoger Weise konnten auch aus den Peptiden Ala-Gly und Val-Gly-Gly die entsprechenden Aminohydantoine [IV, $R_1 = \text{CH}_3$ bzw. $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$] erhalten und durch Mischschmp. und Hydrolyse identifiziert werden.

Abbau im Mikromaßstab.

0,020 g (0,04 m Mol) Cbzo-Leu-Gly-Phe wurden mit 0,2 ml Hydrazinhydrat 6 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt und nach Abdampfen des Hydrazins der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen. Ein Teil der wäßr. Lösung wurde direkt papierchromatographiert, wobei als primärer und stärkster Fleck der des *Phenylalanins* auftrat. Daneben zeigten sich nach einiger Zeit noch schwache verwaschene Flecken, die wahrscheinlich von den Hydraziden herrührten.

Der Rest der wäßr. Lösung wurde 20 Min. gekocht, angesäuert und 48 Stdn. mit Äther extrahiert. Den Ätherrückstand chromatographierten wir, wie im allgemeinen Teil näher beschrieben (S. 963 und Tabelle 2), und erhielten dabei nur einen Fleck vom R_F -Wert des Leucin-Derivates (IV, $R_1 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$). Aus einem Parallelschichtchromatogramm wurde mit Wasser eluiert, in einer Kapillare 5 Stdn. bei 140° hydrolysiert und erneut chromatographiert, wobei nur *Leucin* vorlag.

Monobenzalverbindung des DL-Phenylalanin-hydrazides (VIII).

0,2 g DL-Phenylalanin-hydrazid³ (Schmp. 82 bis 84²⁰) wurden in 2 ml Wasser gelöst, mit 2 n H_2SO_4 auf ein pH von 2 bis 3 gebracht und mit 0,5 g (4 Mol) Benzaldehyd 10 Min. geschüttelt. Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssigem Benzaldehyd mit Äther mehrfach ausgeschüttelt und die wäßr. Lösung, in der sich ein zähes Öl befand, mit NaOH alkalisch gemacht. Nach mehrstündigem Stehen auf Eis trat Kristallisation ein. Ausbeute: 0,22 g (74% d. Th.). Aus Äthanol, Schmp. 131 bis 133°.



Dibenzalverbindung des DL-Phenylalanin-hydrazides (IX).

Wurden 0,2 g Phe-hydrazid in einer wäßr. Lösung (2 ml), die mit NaOH auf ein pH von 8 bis 9 gebracht worden war, mit 0,5 g Benzaldehyd geschüttelt, wobei das pH durch Laugezugabe aufrechterhalten wurde, so konnten nach Aufarbeitung wie unter VIII beschrieben, 0,25 g (63% d. Th.) eines kristallinen Niederschlages erhalten werden, der nach Umkristallisieren aus Äthanol (Nadeln) von 140 bis 142° schmolz.



Abbau eines Glycyl-Peptides.

0,2 g Cbzo-Gly-DL-Ala-Gly wurden mit 0,5 g Hydrazinhydrat wie üblich (6 Stdn. 100°) behandelt. Der Rückstand wurde in 4 ml Wasser gelöst, mit 2 n H_2SO_4 angesäuert und mit Benzaldehyd geschüttelt, worauf bald

²⁰ Im Gegensatz zu den Angaben von *Akabori* und Mitarbeitern¹⁰, die für das Phe-hydrazid als Schmp. 123 bis 124° angeben.

ein dichter Niederschlag ausfiel. Nach Entfernung des überschüssigen Benzaldehyds mit Äther wurde abgesaugt und die wäbr. Lösung papierchromatographiert, wobei nur *Glycin* vorlag. Der Niederschlag wurde in 2 n H_2SO_4 suspendiert und mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Extrakt ließ sich aus viel Äthanol umkristallisieren und schmolz dann von 235 bis 238°. Im Mischschmp. mit der Dibenzalverbindung des Glycin-N-carbonsäuredihydrazids⁹ trat keine Depression ein. Nach energischer Hydrolyse (HCl, 5 Stdn., 140°) lag im Papierchromatogramm nur *Glycin* vor.

Auch im Gly-Tyr konnte das Gly auf analoge Weise bestimmt werden.

Abbau von Lysozym.

30 mg Cbzo-Lysozym² wurden mit 0,5 ml wasserfreiem Hydrazin 8 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend das überschüssige Hydrazin im Vakuumexsikkator entfernt.

Bestimmung der C-AS.

a) Etwas des halbfesten Rückstandes wurde mit Aceton 2 Stdn. gekocht, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und papierchromatographiert, wobei ein deutlicher Fleck von *Leucin* neben einigen schwachen verwaschenen Streifen auftrat.

b) Der Rest des Hydrazinrückstandes wurde in 2 ml Wasser gelöst und 0,5 ml davon mit Benzaldehyd geschüttelt. Nach üblicher Reinigung mit Äther wurde die wäbr. Mutterlauge chromatographiert und gab als einzige Aminosäure *Leucin*, wieder neben einigen verwaschenen sehr schwachen Flecken.

Bestimmung der N-AS.

Die restliche wäbr. Lösung (1,5 ml) wurde 20 Min. gekocht, mit HCl angesäuert und 3 Tage im Apparat mit Äther extrahiert. Den Rückstand chromatographierten wir in der beschriebenen Weise (s. S. 963) und erhielten einen schwachen Fleck mit dem R_F -Wert des ϵ -Cbzo-Lysinderivates [IV, $R_1 = Cbzo \cdot NH(CH_2)_4$]. Wurde aus einem Parallelchromatogramm dieser Fleck mit Wasser eluiert und in einer Kapillare mit HCl (5 Stdn., 140°) hydrolysiert, so lag im Papierchromatogramm nur *Lysin* vor.

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

Dieser und anderen Arbeiten⁵⁻⁹ kam eine Zuwendung zugute, welche die *Rockefeller-Foundation* einem von uns (F. W.) gewährt hat, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.