

# Über Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäuren\*<sup>1</sup>

Von

W. Lautsch und E. Schröder<sup>2</sup>

Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 9. Januar 1957)

Es werden die zur Gewinnung der enantiomorphen und diastereomeren Formen der freien Carbonsäuren von Fermentmodellen aus den Methyl- und Benzylestern der Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäuren verwendeten Verseifungsmethoden besprochen, sowie die N- und C-endständigen Aminosäuren der Polypeptide ermittelt, deren Partialhydrolyse einen statistischen Aufbau der Polypeptidkette erkennen läßt. Die Beobachtungen über das katalytische und optische Verhalten der Fermentmodelle werden auf die Bildung von Einschlußsystemen von Wirkungsgruppe und Substrat zurückgeführt.

Kürzlich haben wir über die Synthese, über die optischen und katalytischen Eigenschaften der Mesohämin-poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäuren) bzw. -(isoleucin-glutaminsäuren) berichtet<sup>3</sup>. Diese Untersuchungen werden ergänzt durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen enantiomorphen bzw. diastereomeren Formen der Fermentmodelle.

Die vorliegende Arbeit behandelt

I. die Synthese der Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester (L,L; D,L; DL,L), der - $\gamma$ -benzylester (L,L; D,L; DL,L), der Mesohämin-poly-(O-acetyl-L-tyrosin-L-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester) sowie der durch Verseifung erhältlichen freien Carbonsäuren,

II. Endgruppen und Aminosäuresequenzen,

III. Messung der katalytischen Eigenschaften der Fermentmodelle,

IV. Synthese der Di- und Tripeptide.

---

\* Herrn Professor Dr. F. Wessely zum 60. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> 28. Mitt.: „Über Fermentmodelle“ von W. Lautsch und Mitarb.; 27. Mitt.: W. Lautsch und R. Wiechert, Kolloid-Z., im Druck.

<sup>2</sup> Auszug aus Dissertation E. Schröder, Freie Universität Berlin (1956).

## I. 1. Synthese der Polypeptidester und Verseifung zu den Polypeptidsäuren

Die Initiierung der Polykondensation der N-Carbonsäureanhydride (NCA) mit Mesoporphyrin-IX-dihydrazid bzw. mit Methanol zwecks Gewinnung der mesoporphyrinsubstituierten Polypeptide bzw. der — zum Studium der Zwischenstoffwirkungen<sup>4</sup> erforderlichen — unsubstituierten Polypeptidester erfolgte unter Variation des Molverhältnisses der NCA von Phenylalanin: Glutaminsäure wie 1:4, 1:2, 1:1 und 3:2 unter Verwendung von Nitrobenzol als Lösungsmittel (siehe Versuchsteil).

Zur Darstellung der freien Polypeptidcarbonsäuren waren die Verseifungsmethoden und -bedingungen zu ermitteln, die die Gewinnung der Polysäuren ohne Racemisierung und Veränderung der prosthetischen Gruppe gestatteten.

a) *Verseifung mit NaOH-Cu(OH)<sub>2</sub>*. Da die alkalische Verseifung von Polypeptidestern zu einer beträchtlichen Racemisierung führt<sup>5</sup>, prüften wir die von B. Bruckner und J. und K. Kovačs<sup>6</sup> beschriebene alkalische Verseifung in Gegenwart von Cu<sup>II</sup>-Hydroxyd. Unter den von uns ermittelten Bedingungen (50°/5 Stdn./0,5 n NaOH) war nur ein geringer Abfall der spezifischen Drehung zu beobachten, auch die prosthetische Gruppe unterlag keiner Veränderung. Nach diesem Verfahren haben wir aus den Polymethylestern L,L-, D,L-, DL,L-, L,DL- und D,DL-Carbonsäuren hergestellt.

b) *Verseifung mit HBr-Eisessig*. Zur Gewinnung der Mesohäminpolypeptide aus den Polybenzylestern wurde das von D. Ben Ishai<sup>7</sup> zur Abspaltung des Carbobenzoxy (Cbo)-Restes und von B. G. Overell und V. Petrov<sup>8</sup> zur Benzylesterspaltung beschriebene Verfahren mit HBr-Eisessig angewendet. Wir fanden, daß unter optimalen Bedingungen (50°/45 Min.) die Benzylgruppen nahezu quantitativ (94% freie Carboxylgruppen) ohne Racemisierung und ohne Hydrolyse der prosthetischen Gruppen abgespalten werden können. Es ist zweckmäßig, die Behandlung mit HBr-Eisessig an den Mesohäminpolypeptiden durchzuführen. Das komplexgebundene Eisen wirkt offensichtlich stabilisierend gegenüber hydroxylierend wirkenden Agentien, denn die Mesoporphyrinpolypeptide

<sup>3</sup> W. Lautsch und E. Schröder, Z. Naturforsch. 9 b, 277 (1954).

<sup>4</sup> W. Lautsch, W. Broser, W. Biedermann und H. Gnichtel, Angew. Chem. 66, 123 (1954), siehe Bild 26, S. 134. — Ferner W. Lautsch, H. Gnichtel, I. Gnichtel und E. Höfling, Kolloid-Z. 141, 132 (1955), vgl. Tabellen 2 und 3.

<sup>5</sup> W. E. Hanby, S. G. Waley und J. Watson, J. Chem. Soc. London 1950, 3009, 3239. — V. Bruckner und J. und K. Kovačs, Naturwiss. 39, 380 (1952).

<sup>6</sup> V. Bruckner, J. und K. Kovačs und A. Kotai, Exper. 10, 166 (1954).

<sup>7</sup> D. Ben Ishai, J. Org. Chem. 19, 62 (1954).

<sup>8</sup> B. G. Overell und V. Petrov, J. Chem. Soc. London 1955, 232.

erfahren bei der HBr-Eisessig-Behandlung eine erhebliche Abspaltung von Wirkungsgruppen.

Zur Prüfung der Frage, inwieweit bei der Verseifung optisch-aktiver copolymerer Peptide Racemisierung eintritt, wurden die in Tabelle 1<sup>9</sup> angeführten optisch-aktiven copolymeren Methyl- und Benzylester bzw. die verseiften Produkte der Hydrolyse mit 48%iger HBr unterworfen

Tabelle 1. Spezifische Drehungen in 24%igem Bromwasserstoff nach Hydrolyse von Poly-phenylalanin-glutaminsäuremethyl- und -benzylestern bzw. nach Hydrolyse der Glutaminsäurebenzyl- und -methylester sowie nach Behandlung bzw. Auflösung von Glutaminsäure und Phenylalanin ( $c = 0,4$  pro Komponente; 2 dm)

		+ $\alpha$	+ $[\alpha]_D^{20}$
1. D-H-Phe-OH .....	—	0,056	5,6°
2. D-H-Phe-OH .....	6 Stdn. gek.	0,054	5,4°
3. L-H-Glu-OH .....	—	0,244	30,5°
4. L-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,224	28°
5. L-H-Glu-OH .....	—	0,336	24,2°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$			
6. L-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,220	27,5°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$			
7. D-H-Phe-OH + DL-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,055	5,5°
8. H-(D-Phe-DL-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,052	5,2°
(über $\gamma$ -Methylester)			
9. H-(D-Phe-DL-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,057	5,7°
(über $\gamma$ -Benzylester)			
10. D-H-Phe-OH + L-H-Glu-OH .....	—	0,30	18,7°
11. D-H-Phe-OH + L-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,27	16,9°
12. D-H-Phe-OH + L-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,26	16,3°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$			
13. H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> .....	6 Stdn. gek.	0,27	16,9°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5$			
14. H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,233	14,6°
(über $\gamma$ -Methylester)			
15. H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,228	14,3°
(über $\gamma$ -Benzylester)			
16. H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,214	26,7°
(über $\gamma$ -Methylester)			
17. H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	6 Stdn. gek.	0,210	26,2°
(über $\gamma$ -Benzylester)			
18. D-H-Phe-OH + L-H-Glu-OH .....	6 Stdn. gek.	0,269	16,8°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_3$			
19. H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OCH <sub>3</sub> .....	6 Stdn. gek.	0,267	16,7°
$L_{\gamma}\text{-OCH}_3$			

<sup>9</sup> Wir benutzen das von E. Brand und J. T. Edsall [Ann. Rev. Biochem. 16, 223 (1947)] eingeführte Abkürzungssystem und benennen die Gruppierung —NHCH(R)—CO— mit ihren ersten 3 Anfangsbuchstaben.

und die beobachteten Drehungen verglichen mit denen der monomeren Aminosäuren nach Lösung bzw. nach Hydrolyse ihrer Ester unter vergleichbaren Bedingungen. Bei denen aus aktiver und inaktiver Komponente bestehenden copolymeren Peptiden blieb bei der Errechnung der spezifischen Drehung die Einwaage der DL-Form unberücksichtigt (siehe Versuchsteil).

Aus Tabelle 1 läßt sich folgendes entnehmen:

1. Da D-Phenylalanin unter den Hydrolysebedingungen nicht racemisiert wird (1 und 2), L-Glutaminsäure nur einen geringen Drehungsabfall zeigt (3 und 4), D-Phenylalanin in dem copolymeren Peptid ebenfalls keine wesentliche Veränderung der spezifischen Drehung erleidet (7, 8 und 9), kann man aus dem Vergleich von 18 und 19 schließen, daß im copolymeren Poly-D-phenylalanin-L-glutaminsäure-methylester die Komponenten im Molverhältnis 1:1 vorliegen. Damit werden unsere früheren Ergebnisse über die grundmolekularen Drehungsbeiträge<sup>3, 10</sup> der Komponenten in copolymeren Peptiden erneut bestätigt.

2. Der Drehungsbeitrag der Phenylalaninkomponenten erfährt bei der Verseifung von copolymeren Peptiden keine Veränderung (vgl. 7, 8, 9). Dies gilt auch für die Glutaminsäurekomponenten, wie der Vergleich von 12 und 13 sowie 4, 16 und 17 ergibt.

3. Bei der Verseifung der copolymeren Peptide ist der Glutaminsäureanteil empfindlicher als in der reinen Polyglutaminsäure, wie ein Vergleich von 4, 16, 17 und 11 bis 15 zeigt.

Wir haben schließlich auch die Abspaltung der Benzylester mit der HBr-Nitrobenzolmethode von *N. F. Albertson* und *F. C. McKay*<sup>11</sup> geprüft. Nach diesem Verfahren ließ sich der Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester in etwa 50% Ausbeute verseifen,  $[\alpha]_D^{20} = +26^\circ$ . 94% der Carboxylgruppen waren nachweisbar. Wegen der schweren Löslichkeit der copolymeren Peptide in Nitrobenzol haben wir die Arbeitsweise in Eisessig vorgezogen.

c) *Das Hydrazinverfahren.* Die von *V. Bruckner* und *J. und K. Kovacs*<sup>5, 12</sup> zur Verseifung von Polypeptidestern angegebene Methode mit wasserfreiem Hydrazin und nachfolgender saurer Hydrolyse der Polyhydrazide führt zu befriedigenden Ergebnissen, wenn Hydrazin direkt der Lösung des Polyesters nach der Polykondensation zugesetzt wird. Wir erhielten aus Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester ( $\text{OCH}_3 = 21,68\%$ ) über das Polyhydrazid (N ber.: 29,36%; N gef.: 29,15% und 28,85%;  $\text{OCH}_3$  ber.: 0%;  $\text{OCH}_3$  gef.: 0,24%) durch saure Verseifung eine Poly-L-glutaminsäure, bei der nach Hydrolyse mit HBr  $[\alpha]_D^{20} =$

<sup>10</sup> *W. Lautsch, R. Schütze und W. Broser, Kolloid-Z. 133, 1 (1953).*

<sup>11</sup> *N. F. Albertson und F. C. McKay, J. Amer. Chem. Soc. 75, 5323 (1953).*

<sup>12</sup> *V. Bruckner und J. und K. Kovacs, J. Chem. Soc. London 1953, 145.*

= + 26,8° betrug; analog behandelte monomere Glutaminsäure zeigte  $[\alpha]_D^{20} = + 27,3^\circ$ .

Das Verfahren ließ sich jedoch auf wirkungsgruppensubstituierte Polypeptide nicht anwenden, da eine beinahe vollständige Abspaltung der Farbstoffkomponente erfolgte. Darüber hinaus erfolgt bei der Umwandlung in das Polyhydrazid gleichzeitig eine Hydrazinolyse der Polypeptidkette, was mit einem starken Abfall des Molgewichtes verbunden ist<sup>6, 12</sup> (vgl. auch *S. Akabori, K. Ohno* und *K. Narita*<sup>13</sup>, ferner *K. Schlögl, F. Wessely* und *E. Wawersich*<sup>14</sup>).

Eine Übersicht über die spezifischen Drehungen der von uns hergestellten Poly-L-glutaminsäuren und der copolymeren Peptide zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2. Spezifische Drehungen von Poly-L-glutaminsäure und Poly-phenylalanin-glutaminsäuren (Molverhältnis 1:1) in 0,5 n NaOH (1 dm  $c = 1$ )

Substanz	Hergestellt aus	Verseifungsverfahren	$[\alpha]_D^{20}$
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Benzylester	HBr-Eisessig	— 75°
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Benzylester	HBr-Nitrobenzol	— 74°
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Methylester	NaOH/Cu(OH) <sub>2</sub>	— 77°
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Methylester	Hydrazin	— 74°
H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Methylester	NaOH/Cu(OH) <sub>2</sub>	— 24°
H-(D-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Benzylester	HBr-Eisessig	— 25°
H-(D-Phe-DL-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Methylester	NaOH/Cu(OH) <sub>2</sub>	— 3°
H-(D-Phe-DL-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Benzylester	HBr-Eisessig	— 4°
H-(L-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Methylester	NaOH/Cu(OH) <sub>2</sub>	— 38°
H-(L-Phe-L-Glu) <sub>n</sub> -OH .....	Benzylester	HBr-Eisessig	— 36°

## 2. Mesohäminpolypeptide

Es wurden die in der Tabelle 3 aufgeführten mesohäminsubstituierten Polypeptide hergestellt. Ihr Eisengehalt wurde durch Extinktionsbestimmung der Pyridinhämochromogenbanden bei 518  $m\mu$  und 547  $m\mu$  ermittelt und die Werte verglichen mit den durch kolorimetrische Eisenbestimmung mit  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl erhaltenen. Der angegebene Mittelwert wurde den katalytischen Messungen zugrunde gelegt. Aus den in der letzten Spalte angegebenen Substanzmengen in mg, die 50  $\gamma$  Fe entsprechen, kann das durchschnittliche Molekulargewicht der betreffenden Fermentmodelle unter der Voraussetzung abgeleitet werden, daß die Polykondensation ausschließlich von dem Mesoporphyrinhydrazid

<sup>13</sup> *S. Akabori, K. Ohno* und *K. Narita*, Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 214 (1952).

<sup>14</sup> *K. Schlögl, F. Wessely* und *E. Wawersich*, Naturwiss. **41**, 38 (1954); Mh. Chem. **85**, 957 (1954).

initiiert wurde. Darnach schwankt das Molgewicht unserer Modelle etwa zwischen 14000 und 35000.

Tabelle 3. Fe-Gehalt der Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäuren

Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäure			Fe-Gehalt in $\gamma$ /mg				
Form	Mol-verh.	hergestellt aus	aus Extinktionsmessungen (518 und 547 $m\mu$ )		Kolorimetrische Bestimmung	Mittelwert	50 mg Fe = mg Substanz
			1. Best.	2. Best.			
DL,L	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	2,36	—	1,92	2,14	23,4
L,DL	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	3,95	—	3,85	3,90	12,8
L,L	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	4,70	—	4,35	4,52	11,1
D,L	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	4,05	4,40	4,30	4,25	11,8
D,DL	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	3,78	4,18	4,0	4,0	12,5
L	0 : 1	$\gamma$ -Methylester	1,15	1,18	—	1,17	42,7
L,L	1 : 1	$\gamma$ -Benzylester	1,32	1,28	—	1,30	38,5
D,L	1 : 1	$\gamma$ -Benzylester	1,69	1,48	—	1,58	31,6
DL,L	1 : 1	$\gamma$ -Benzylester	1,56	1,49	—	1,52	32,9
DL,DL	3 : 2	$\gamma$ -Methylester	2,04	2,05	—	2,04	24,5
DL,DL	1 : 1	$\gamma$ -Methylester	2,5	2,4	—	2,45	20,4
DL,DL	1 : 2	$\gamma$ -Methylester	2,83	2,43	—	2,63	19,0
DL,DL	1 : 4	$\gamma$ -Methylester	4,98	5,26	—	5,12	9,8
DL	0 : 1	$\gamma$ -Methylester	34,6	34,6	—	34,6	1,45

## II. Endgruppen und Aminosäuresequenzen

Kürzlich hatten wir aus den Enddrehungen von copolymeren Peptiden mit wechselndem Molverhältnis die grundmolekularen Drehungsbeiträge der Komponenten abgeleitet und aus der Tatsache, daß diese vom Kondensationsverhältnis abhängig sind, auf das Vorliegen von Copolymeren und aus dem Kurvenverlauf der zeitlichen Abhängigkeit der optischen Drehung während der Polykondensation geschlossen, daß bei Überwiegen eines der Reaktionspartner zunächst Copolymere aufgebaut werden, in welchen die Partner annähernd regelmäßig wechseln, während — infolge der Verarmung an unterschüssiger Komponente — später die Einheiten im Copolymerisat vorwiegend aus der überschüssigen Komponente bestehen.

Wir haben diese aus der optischen Drehung gezogenen Schlüsse überprüft, indem wir

1. in den nichtwirkungsgruppensubstituierten Peptiden die N- und C-endständigen Aminosäuren bestimmt haben, und

2. die in Betracht kommenden copolymeren Peptide wie auch unsere Fermentmodelle der Partialhydrolyse unterworfen haben.

Zu 1:

a) *Bestimmung der N-endständigen Aminosäure.* Nach dem DNFB-Verfahren von *F. Sanger*<sup>15</sup> bestimmten wir die N-endständige Aminosäure in den Poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäuren) mit den Molverhältnissen 2 : 1, 1 : 1 und 1 : 2 durch Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol, anschließender Hydrolyse der DNP-Polypeptide (48% HBr/24 Stdn./100°) und anschließender Extraktion mit Äther und papierchromatographischer Trennung (Phthalatpuffer, pH = 6, tert.-Amylalkohol). In derselben Weise wurde die N-endständige Aminosäure in den Mesohämin-polyphenylalanin-glutaminsäuren mit den Molverhältnissen 1 : 1 und 2 : 1 ermittelt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4. N-endständige Aminosäuren in Polyphenylalanin-glutaminsäuren mit wechselnden Molverhältnissen

DNP-Derivat von	$R_F$ -Werte	
	DNP-Phe	DNP-Glu
L(DL)-H-Glu-OH . . . . .	—	0,14 <sub>3</sub>
DL-H-(Phe)-OH . . . . .	0,45	—
DL-H-(Phe-Glu) <sub>n</sub> -OH (2 : 1) . . .	0,44	0,11 <sub>2</sub>
(1 : 1) . . .	0,45 <sub>5</sub>	0,12 <sub>7</sub>
(1 : 2) . . .	0,46	0,11 <sub>3</sub>

Es ist ersichtlich, daß in den copolymeren Peptiden mit den Molverhältnissen 2 : 1 und 1 : 2 beide Komponenten als N-endständige Aminosäuren nachweisbar sind. Dazu sei bemerkt, daß man wohl nur bei höherem Überschuß der einen Komponente mit dem bevorzugten Auftreten der überschüssigen Aminosäure als Endgruppe wird rechnen können. Darüber hinaus muß eine Spaltung der Peptidkette unter den Verseifungsbedingungen in Betracht gezogen werden.

b) *C-endständige Aminosäuren.* Zur Bestimmung der C-endständigen Aminosäuren verwendeten wir das von *F. Wessely*<sup>14</sup> und Mitarbeitern bzw. *S. Akabori*<sup>13</sup> beschriebene Hydrazinolyseverfahren, nach welchem die C-endständige Aminosäure als freie Carbonsäure anfällt, während die Aminosäurereste der Kette als Benzalverbindung abgetrennt werden.

Wir haben die Poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäuren) mit den Molverhältnissen 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 und 0 : 1 mit dem in der Tabelle 5 wiedergegebenen Ergebnis geprüft.

Zum sicheren Nachweis der endständigen C-Aminosäuren erwies sich auf Grund von Voruntersuchungen das Verhältnis von 10 mg Polypeptid zu 1 cm<sup>3</sup> Hydrazin als nötig, auch war eine Variation der sonstigen Reaktionsbedingungen sowie eine Analyse unter wechselnden

<sup>15</sup> *F. Sanger*, Biochemic. J. **39**, 507 (1945).

Hydrazinolysebedingungen erforderlich, da sich sonst unter Umständen Phenylalanin sowie Glutaminsäure bei Prüfung des Polyesters dem Nachweis als endständige Aminosäure entziehen können (vgl. 14).

Tabelle 5. Bestimmung der C-endständigen Aminosäuren in den Polyphenylalanin-glutaminsäuren mit wechselnden Molverhältnissen

Peptide	Mol- verhält- nis	$R_F$ -Werte							
		Butanol : Eisessig : $H_2O = 4 : 1 : 1$ Hydrazinolyse				Essigester : Pyridin : $H_2O = 4 : 2 : 2$ Hydrazinolyse			
		12 Stdn./100°		24 Stdn./100°		12 Stdn./100°		12 Stdn./150°	
		Phe	Glu	Phe	Glu	Phe	Glu	Phe	Glu
H-Phe-OH . . . . .	—	0,45 <sub>7</sub>	—	—	—	—	—	—	—
H-Phe-Phe-OH . . . . .	—	0,46 <sub>5</sub>	—	—	—	—	—	—	—
H-(Phe-Glu) <sub>n</sub> -OH . . .	2 : 1	0,46 <sub>7</sub>	0,17	0,44 <sub>3</sub>	0,17 <sub>1</sub>	0,57 <sub>8</sub>	0,14	0,57	—
	1 : 1	0,45 <sub>8</sub>	0,16 <sub>7</sub>	0,44 <sub>1</sub>	0,16 <sub>8</sub>	0,58 <sub>2</sub>	0,14 <sub>7</sub>	0,56 <sub>7</sub>	—
	1 : 2	0,45 <sub>7</sub>	0,16 <sub>7</sub>	—!	0,15 <sub>7</sub>	0,58 <sub>6</sub>	0,14 <sub>3</sub>	0,57 <sub>2</sub>	—
H-(Phe-Glu) <sub>n</sub> -OCH <sub>3</sub> L <sub>γ</sub> -OCH <sub>3</sub> . . . . .	1 : 1	0,45 <sub>7</sub>	—!	—	—	0,57 <sub>5</sub>	—!	0,58	—
H-(Glu) <sub>n</sub> -OH . . . . .	—	—	—	—	0,15 <sub>7</sub>	—	0,14 <sub>2</sub>	—	—

Zu 2: *Partialhydrolyse*. Die Frage, ob man es bei den Polyphenylalanin-glutaminsäuren sowie bei den entsprechenden Fermentmodellen mit einem statistischen Aufbau der Polypeptidkette zu tun hat, oder aber ob die beiden Komponenten regelmäßig alternierend die Kette aufbauen, war der Anlaß, eine Partialhydrolyse durchzuführen, wie sie von *F. Sanger* und Mitarbeitern<sup>16</sup>, *V. Du Vigneaud*<sup>17</sup>, *H. Tuppy*<sup>18</sup> und anderen erfolgreich zur Aufklärung von Hormonen mit Polypeptidcharakter verwendet wurde. Eine Entscheidung müßte bereits durch den Nachweis von Di- und Tripeptiden möglich sein.

Wir haben deshalb zunächst die in Kapitel II, 3 beschriebenen Di- und Tripeptide auf ihr Verhalten bei der Partialhydrolyse geprüft. Das Ergebnis beinhaltet Tabelle 6.

Wir fanden, daß die Dipeptide in den angegebenen Zeiten teilweise gespalten, teilweise noch nachweisbar sind, während die Tripeptide schon nach 2 Tagen gespalten wurden, und zwar bevorzugt an der gemischten Peptidbindung, so daß neben den monomeren nur H-Phe-Phe-OH und H-Glu-Glu-OH nachweisbar sind, während die chromatographisch schwer trennbaren H-Phe-Glu-OH und H-Glu-Phe-OH nur noch andeutungsweise erkennbar sind (+).

<sup>16</sup> *F. Sanger*, Biochemic. J. 44, 126 (1949); 45, 563 (1949).

<sup>17</sup> *V. Du Vigneaud*, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4879 (1953).

<sup>18</sup> *H. Tuppy*, Biochim. Biophys. Acta 11, 449 (1953). — *H. Tuppy* und *H. Michl*, Mh. Chem. 84, 1011 (1953).



Tabelle 6. Partialhydrolyse (konzentrierte HCl/50%) von Di- und Tripeptiden nach 2, 4 und 6 Tagen  
 Lösungsmittel: Methyläthylketon: Pyridin: Wasser = 4:2:2 (Laufzeit 4 bis 5 Stdn., absteigend; Papier: Schleicher und  
 Schüll 2043 bm). + = andeutungsweise erkennbar

Peptid	H-Glu-Glu-OH			H-Glu-OH			H-Glu-Phe-OH H-Phe-Glu-OH			H-Phe-OH			H-Phe-Phe-OH		
	nach Tagen			nach Tagen			nach Tagen			nach Tagen			nach Tagen		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
H-Phe-Phe-OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Phe-Glu-OH	—	—	—	0,08 <sub>7</sub>	0,12 <sub>4</sub>	0,12 <sub>8</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Glu-Phe-OH	—	—	—	0,09 <sub>7</sub>	0,12 <sub>5</sub>	0,11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Glu-Glu-OH	—	—	—	0,15 <sub>7</sub>	0,14 <sub>3</sub>	0,14 <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Phe-Phe-Glu-OH	—	—	—	0,09 <sub>5</sub>	0,12 <sub>5</sub>	0,11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Phe-Glu-Phe-OH	—	—	—	0,12 <sub>5</sub>	0,11 <sub>5</sub>	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
H-Glu-Glu-Phe-OH	—	—	—	0,13 <sub>6</sub>	0,14 <sub>1</sub>	0,12 <sub>5</sub>	+	0,25 <sub>6</sub>	+	—	—	—	—	—	—
H-Glu-Phe-Phe-OH	—	—	—	0,13 <sub>6</sub>	0,14 <sub>5</sub>	0,10 <sub>3</sub>	0,24 <sub>6</sub>	0,25 <sub>3</sub>	0,19 <sub>5</sub>	—	—	—	—	—	—

Tabelle 7. Partialhydrolyse der Polyphenylalanin-glutaminsäuren (Molverhältnis 2:1 und 1:1).  
 Lösungsmittel: Methyläthylketon: Pyridin: Wasser = 4:2:2 (Laufzeit 4 bis 5 Stdn., absteigend; Papier: Schleicher und  
 Schüll 2043 bm)

Polyphenylalanin- glutaminsäure	Molverh.	Tage	H-Phe-Phe-OH			H-Phe-OH			H-Glu-Phe-OH H-Phe-Glu-OH			H-Glu-OH			H-Glu-Glu-OH			
			HCl			HCl			HCl			HCl			HCl			
			Konz. 37°	Konz. 50°	9% 100°	Konz. 37°	Konz. 50°	9% 100°	Konz. 37°	Konz. 50°	9% 100°	Konz. 37°	Konz. 50°	9% 100°	Konz. 37°	Konz. 50°	9% 100°	
2:1	2	+	0,71	+	+	+	0,54 <sub>5</sub>	0,27 <sub>8</sub>	0,26 <sub>6</sub>	—	—	—	0,15 <sub>5</sub>	0,14 <sub>4</sub>	0,12	0,05 <sub>4</sub>	0,04 <sub>5</sub>	—
	4	+	0,67 <sub>5</sub>	0,67 <sub>8</sub>	+	0,54 <sub>6</sub>	0,27 <sub>6</sub>	0,22 <sub>5</sub>	—	—	—	—	0,15 <sub>4</sub>	0,10 <sub>3</sub>	0,10	0,04 <sub>5</sub>	0,03 <sub>1</sub>	—
	6	0,71	0,68 <sub>4</sub>	+	0,57 <sub>1</sub>	0,55 <sub>1</sub>	0,57 <sub>1</sub>	0,27 <sub>4</sub>	0,23 <sub>7</sub>	—	—	—	0,12 <sub>8</sub>	0,10 <sub>9</sub>	0,12 <sub>8</sub>	0,04 <sub>6</sub>	+	—
1:1	2	+	—	—	—	—	—	0,27 <sub>7</sub>	—	—	—	—	0,15	—	—	0,04 <sub>5</sub>	—	—
	4	0,71	—	—	—	—	—	0,27 <sub>6</sub>	—	—	—	—	0,14 <sub>7</sub>	—	—	0,04 <sub>6</sub>	—	—
	6	0,70 <sub>5</sub>	—	—	—	—	—	0,27 <sub>2</sub>	—	—	—	—	0,14 <sub>1</sub>	—	—	0,04 <sub>6</sub>	—	—

In Hinblick auf die Einheitlichkeit von H-Phe-Glu-Phe-OH wird auf II, 3 verwiesen.

Das Ergebnis der Partialhydrolyse der Polyphenylalanin-glutaminsäuren mit den Molverhältnissen 2:1 und 1:1 zeigt Tabelle 7.

Der Nachweis von H-Glu-Glu-OH bzw. H-Phe-Glu-OH (H-Glu-Phe-OH) bei der Durchführung der Hydrolyse bei 37° sowie das Auftreten von H-Phe-Phe-OH erst nach längeren Hydrolysezeiten sowie das Verschwinden von H-Glu-Glu-OH unter energischeren Reaktionsbedingungen lassen Rückschlüsse auf die verschiedene Spaltungsgeschwindigkeit der Peptidbindungen zu. Die Phe-Phe-Bindung erwies sich als am schwersten spaltbar. Der Nachweis von H-Phe-Phe-OH und H-Glu-Glu-OH auch für das Molverhältnis 1:1 schließt einen regelmäßig alternierenden Aufbau aus den Komponenten aus. Der Aufbau der Polypeptidkette während der Polykondensation erfolgt statistisch.

### III. Messung der katalytischen Eigenschaften der Fermentmodelle

Wir haben die besprochenen Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäuren mit Hilfe der manometrischen Methodik nach *Warburg* auf ihre katalytischen Eigenschaften geprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Tabelle 8.

#### Diskussion der Meßergebnisse

1. *p*-Phenylendiamin. Man entnimmt Tabelle 8, daß die Mischung aus Polypeptid + Mesohämin die Dehydrierung stärker katalysiert als Mesohämin (welches in der vorliegenden Meßreihe durchweg als Na-Salz angewendet wird; früher<sup>3</sup> wurde der *Ester* des Mesohämins zum Vergleich herangezogen). Die Mesohämin-poly-DL-glutaminsäure katalysiert am stärksten, wenn die positive Katalyse durch das *un*substituierte Polypeptid Berücksichtigung findet. Damit steht die hemmende Wirkung der unsubstituierten Polypeptide im Einklang, sie ist besonders ausgeprägt bei dem Molverhältnis 1:1. Wir konnten beweisen, daß diese Hemmung auf bevorzugter Einschließung des Semichinons beruht, ein Ergebnis, welches auf Grund der Verschiebung der Bandenmaxima der Absorptionsspektren sowie der Hemmung der Dehydrierung von *p*-Phenylendiamin in Gegenwart von  $\beta$ -Cyclodextrin, Na-Desoxycholat und Poly-DL-phenylalanin-glutaminsäure (1:1) gewonnen wurde<sup>19</sup>. Darüber hinaus haben wir feststellen können, daß bei Einschließungsvorgängen auch das Redoxpotential des Substrats verschoben wird. Wir konnten durch Studium des Systems 3-Hydroxythiazin- $\beta$ -Dextrin<sup>20</sup> zeigen, daß durch

<sup>19</sup> W. Lautsch und Mitarb., Kolloid-Z. 144, 82 (1955), vgl. insbesondere Abb. 6a und 6b, S. 91.

<sup>20</sup> W. Broser und Ch. Bahr, Z. Naturforsch. 10 b, 121 (1955).

Tabelle 8. O<sub>2</sub>-Verbrauch und katalytische Wirkung der Polyphenylalanin-glutaminsäuren (20° C, Phosphatpuffer)

Fermentmodelle Mesohämmin-polyphenylalanin-glutaminsäure (I) bzw. Mesohämmin (5 γ Fe) + Polyphenylalanin-glutaminsäure (II)		5 γ Fe entsprechen mg Modell/Gefäß	Polyphenylalanin-glutaminsäuren O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.					
Form	Mol-verhältnis		p-Phenylendiamin <sup>3</sup>	L(D)-Adrenalin <sup>4</sup>	Tetrachlorsalicoin <sup>5</sup>	Furoin <sup>6</sup>	α-Pyridoin <sup>7</sup>	
I	DL-DL	3 : 2	2,45	—	—	46	—	—
		1 : 1	2,04	5	46	46	84	200
		1 : 2	1,9	14	46	46	—	—
		1 : 4	0,98	—	—	—	—	—
		0 : 1	1,71	22	—	—	—	—
II	DL-DL	1 : 1	—	—	—	—	—	
		1 : 2	—	—	—	—	—	
		1 : 4	—	—	—	—	—	
		0 : 1	—	—	—	—	—	
Ohne Zusatz . . . .		—	—	—	—	—	—	
Mesohämmin (5 γ) . . . .		—	—	—	—	—	—	
I	L-L <sup>1</sup> . . . . .	1 : 1	1,11	—	—	—	—	—
	L-L <sup>2</sup> . . . . .	1 : 1	3,85	—	—	—	—	—
	L-DL <sup>1</sup> . . . . .	1 : 1	1,28	—	—	—	—	—
	DL-L <sup>1</sup> . . . . .	1 : 1	2,34	—	—	—	—	—
	DL-L <sup>2</sup> . . . . .	1 : 1	3,29	—	—	—	—	—
	D-L <sup>1</sup> . . . . .	1 : 1	1,18	—	—	—	—	—
	D-L <sup>2</sup> . . . . .	1 : 1	3,16	—	—	—	—	—

<sup>1</sup> Aus γ-Methylester.<sup>2</sup> Aus γ-Benzylester.<sup>3</sup> 0,0434 mg p-Phenylendiamin in 4,8 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer bei pH = 7,3 + 0,2 cm<sup>3</sup> Pyridin, aufgefüllt auf 6 cm<sup>3</sup> unter Zugabe der obengenannten Fermentmodelle bzw. unsubstituierten Polyphenylalanin-glutaminsäuren.<sup>4</sup> 10 mg L(D)-Adrenalin in 4,8 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer bei pH = 7,3 + 0,2 cm<sup>3</sup> Pyridin, aufgefüllt auf 6 cm<sup>3</sup> unter Zugabe der obengenannten Fermentmodelle bzw. unsubstituierten Polyphenylalanin-glutaminsäuren (Meßdauer 30 Min. extrapoliert auf 60 Min.).<sup>5</sup> 5 mg Tetrachlorsalicoin (Meßdauer 30 Min. extrapoliert auf 60 Min.).<sup>6</sup> 10 mg Furoin (Meßdauer 30 Min. extrapoliert auf 60 Min.).<sup>7</sup> 10 mg Pyridoin (Meßdauer 6 Min. extrapoliert auf 60 Min.).

Einschließung die  $E_{I_1}$ ,  $E_{E_2}$ - und  $E_m$ -Potentiale erhöht werden, das heißt, daß das Substrat im Einschluß ein stärkeres Oxydationsmittel darstellt, und daß der Effekt mit einer gleichzeitigen Veränderung der pK-Werte verknüpft ist.

Damit im Einklang steht die höhere katalytische Wirksamkeit der Mesohämmin-polyphenylalanin-glutaminsäuren. Zwangsläufig muß die

phenylalanin-glutaminsäuren gegen verschiedene Substrate  
pH = 7,3 + 0,2 cm<sup>3</sup> Pyridin)

Substrate									
p-Phenylendiamin <sup>8</sup>		L(D)-Adrenalin <sup>4</sup>		Tetrachlorsalicycin <sup>5</sup>		Furoin <sup>6</sup>		α-Pyridoin <sup>7</sup>	
O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.	Katal. Wirkung	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.	Katal. Wirkung	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.	Katal. Wirkung	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.	Katal. Wirkung	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup> /Stdn.	Katal. Wirkung
51	—	—	—	48	2	—	—	—	—
57	52	132	86	66	20	110	26	1980	1780
61	47	102	56	66	20	—	—	—	—
62	—	—	—	—	—	—	—	—	—
68	46	82	—	70	—	—	—	—	—
40	35	218	174	104	58	—	—	1960	1760
45	31	—	—	—	—	—	—	—	—
50	?	—	—	—	—	—	—	—	—
52	30	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	44	—	40	—	84	—	190	—
35	20	210	166	72	32	132	48	1860	1670
58	—	140	—	—	—	—	—	—	—
58	—	140	—	—	—	—	—	—	—
—	—	130	—	—	—	—	—	—	—
55	—	130	—	—	—	—	—	—	—
55	—	120	—	—	—	—	—	—	—
62	—	122	—	—	—	—	—	—	—
58	—	134	—	—	—	—	—	—	—

Mesohämin-poly-DL-glutaminsäure den höchsten katalytischen Wert besitzen, weil sie beim Vergleich mit den copolymeren Peptiden die geringsten Wechselwirkungen mit dem Substrat eingeht, die sich als Katalysehemmungen zu erkennen geben.

In der 26. Mitteilung<sup>21</sup> konnten wir die Tatsache begründen, daß die Dehydrierungsgeschwindigkeit unserer Fermentmodelle auf additiven Effekten mit teils positiven, teils negativen Beiträgen beruht, welche auf Zwischenstoffwirkungen der Polypeptidkette mit der Wirkungsgruppe bzw. dem Substrat zurückzuführen sind<sup>22</sup>. Wir konnten mit Hilfe der Redoxtitration zeigen, daß die Mesohämin-IX-poly-DL-phenylalanin-glutaminsäure ein um 110 mV<sup>21</sup> gegenüber der Mesohämin-IX-di-glutaminsäure<sup>23</sup> positiveres Redoxpotential besitzt, und daß diese

<sup>21</sup> W. Lautsch, W. Broser und Kl. Becker, Z. Elektrochem. **61**, 174 (1957).

<sup>22</sup> Vgl. Anm. 19, Kapitel III, S. 90.

<sup>23</sup> W. Lautsch und W. Gehrmann in Anm. 19, Abb. 19, S. 102. — W. Lautsch, W. Gehrmann, R. Pasedag und Kl. Prater, Chem. Ber. **90**, 470 (1957).

Potentialverschiebung auf Einschließungserscheinungen beruht, denn das Potential des Mesohämins erfährt sowohl durch den Zusatz von wirkungsgruppenfreier Poly-DL-phenylalanin-glutaminsäure, wie auch von  $\gamma$ -Dextrin eine Erhöhung (60 bis 20 mV). Da wir zeigen konnten, daß die Potentialerhöhung des Hämins-IX durch  $\gamma$ -Dextrin auf Einschließungsverbindungsbildung beruht — was sich sowohl auf Grund des Redoxverhaltens wie auch auf Grund von spektrophotometrischen Untersuchungen beweisen ließ —, steht nunmehr fest, daß auch die zwischenmolekularen Wechselbeziehungen der Polypeptidkette mit der Häminwirkungsgruppe auf Einschließungserscheinungen zurückzuführen sind. In diese Deutung fügt sich auch zwanglos die Tatsache ein, daß die Mesohämin-IX-polypeptide ein höheres Redoxpotential besitzen als die Mischung aus Wirkungsgruppe und Polypeptid. Somit geht in die Dehydrierungsgeschwindigkeit gemäß der *Nernstschen* Beziehung das Redoxpotential des Katalysators über die Konzentration der Oxydationsstufe ein.

2. *Endiole*<sup>24</sup>. Von den untersuchten Endiolen L-(D)Adrenalin, Tetrachlorsalicyoin, Furoin und  $\alpha$ -Pyridoin liegen Adrenalin<sup>25</sup> und  $\alpha$ -Pyridoin (Stabilisierung durch H-Brücken)<sup>26</sup> ganz oder überwiegend als Endiole vor. Man wird deshalb erwarten können, daß durch Einschließungserscheinungen ausgelöste Polarisierungseffekte, die zu einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung auf das Endiol führen und in einer Erhöhung der Dehydrierungsgeschwindigkeit in Erscheinung treten sollten, ausbleiben. Dies ist in der Tat der Fall, wie man Tabelle 8 entnimmt. Der Zusatz von Polyphenylalanin-glutaminsäuren im wechselnden Molverhältnis bewirkt keine Veränderung des O<sub>2</sub>-Blindwertes, Mesohämin und die Mischung aus Mesohämin + Poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäure) beschleunigen die Oxydation stark, mit steigendem Glutaminsäuregehalt im Polypeptid sinkt die Dehydrierungsgeschwindigkeit. Vorerst unerklärlich ist die Tatsache, daß die Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäuren jedoch die höchste sauerstoffübertragende Wirkung besitzen, wenn man nicht die Annahme macht, daß ein bestimmter Gehalt an Phenylalanineinheiten für elektronische Wechselwirkungen mit dem aromatischen Substrat von Bedeutung ist. Die optisch-aktiven Fermentmodelle zeigten keine sterische Spezifität beim Vergleich von L- und D-Adrenalin in Bestätigung früherer Ergebnisse<sup>27</sup>. Auch die diastereomeren Fermentmodelle zeigen keine wesentlicheren Unterschiede gegenüber der DL-Form. Wir konnten ferner keine ins Auge fallenden Unterschiede in der katalytischen Wirkung von Fermentmodellen feststellen,

<sup>24</sup> H. von Euler, „Reduktone“. Stuttgart. 1950.

<sup>25</sup> Vgl. Anm. 24, S. 29.

<sup>26</sup> H. R. Hensel, Angew. Chem. **65**, 491 (1953).

<sup>27</sup> Vgl. Anm. 19, Abb. 21, S. 103.

die der alkalischen Verseifung der Methylester bzw. der HBr-Spaltung der Benzylester entstammen, was wiederum nicht überraschend ist, da durch die Einwirkung der verseifend wirkenden Agentien die ursprünglich vorhandene Strukturierung der Polypeptidester vermutlich zerstört wird (vgl.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration unserer Fermentmodelle<sup>28</sup>).

Tetrachlorsalicoïn, dessen Diketon wir im Hinblick auf seine zwischenmolekularen Wechselbeziehungen zu Eiweißkörpern (Albumin, Globin) auf die Bildung von Einschlußsystemen<sup>29</sup> untersucht haben, erwies sich nur in Gegenwart von Pyridin als dehydrierbar. Bemerkenswert ist, daß die Mischung aus Mesohämin und Polypeptid die höchste Dehydrierungsgeschwindigkeit zeigte. Auch Furoïn erwies sich nur in Gegenwart von Pyridin als dehydrierbar. Die molekular dispers gelöste Wirkungsgruppe war katalytisch am wirksamsten.

Pyridoin ist als durch H-Brücken stabilisiertes Endiol bereits ohne Pyridinzusatz dehydrierbar, ein Pyridinzusatz — nur diese Meßwerte sind in Tabelle 8 enthalten — bewirkte eine starke Erhöhung der Dehydrierungsgeschwindigkeit, die Mesohämin-poly-phenylalanin-glutaminsäure (Molverhältnis 1:1) war der wirksamste Katalysator, die sauerstoffübertragende Wirkung unterscheidet sich jedoch nur unwesentlich von der Mischung aus Wirkungsgruppe und Polypeptid.

Setzt man die Dehydrierungsgeschwindigkeit von  $\alpha$ -Pyridoin durch die Mesohämin-poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäure) (1:1) = 1, so ist die von Adrenalin 1/20, p-Phenylendiamin 1/40, Furoïn und Tetrachlorsalicoïn 1/60.

Wir haben eine Reihe weiterer  $\alpha$ -Hydroxyketone im Hinblick auf ihr Dehydrierungsvermögen durch unsere Fermentmodelle geprüft, als nicht dehydrierbar erwiesen sich Benzoin, m,m'-Dichlor- und p,p'-Dijodbenzoin, o,o'-Dinitrobenzoin, p,p'-Diacetaminobenzoin, 2,2'-Dimethoxy- und 5,5'-Dibrombenzoin, Salicoïn, Chinaldoin, Diphenylbenzoin und Lauroïn.

#### IV. Tripeptidsynthesen

Von den benötigten Di- und Tripeptiden mit Phenylalanin und Glutaminsäure als Komponenten ist DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin bereits von *F. Fischer*<sup>30</sup> und *F. Wessely* und Mitarb.<sup>31</sup> nach der Azidmethode erhalten worden, wobei letzterer besonders auf die Kristallisationshemmung der DL-Formen hingewiesen hat. Es konnte aber auch nach der Anhydridmethode von *Boissonnas*<sup>32</sup> synthetisiert werden.

<sup>28</sup> Vgl. Anm. 19, Abb. 3, S. 88.

<sup>29</sup> Vgl. Anm. 19, Kapitel IV, S. 95. — *W. Lautsch, W. Bandel* und *W. Broser*, Z. Naturforsch. 11 b, 282 (1956).

<sup>30</sup> *E. Fischer*, Ber. dtsh. chem. Ges. 37, 3062 (1904).

<sup>31</sup> *F. Wessely, K. Schlögl* und *G. Korger*, Mh. Chem. 82, 671 (1951).

<sup>32</sup> *R. A. Boissonnas*, Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951).

DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäure wurde analog nach beiden Verfahren gewonnen.  $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin ließ sich aus Cbo-DL-glutaminsäureanhydrid nach *Le Quesne* und *Young*<sup>33</sup> herstellen und vom  $\gamma$ -Peptid durch Fraktionierung mit Soda abtrennen. Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-glutaminsäure-äthylester fiel in kristallisierter Form an, lieferte jedoch bei der Verseifung ein öliges Cbo-Dipeptid, aus dem  $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-glutaminsäure erhalten wurde.

Auch DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-DL-glutaminsäure ist aus Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin mit DL-Glutaminsäurediäthylester nur im amorphen Zustande zu erhalten. Die Umsetzung mit L-Glutaminsäuredibenzylester dagegen führte zum kristallisierten Hydrat der DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-L-glutaminsäure. DL-Glutamyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin wurde nach der Azidmethode als Hydrat kristallisiert erhalten. Phenylalanyl-glutamyl-phenylalanin und Glutamyl-glutamyl-phenylalanin wurden nach *Boissonnas* als DL-Formen nur im amorphen Zustand gewonnen.

### Experimenteller Teil

#### I. Synthesen der Fermentmodelle und der unsubstituierten Polypeptide

1. *DL-Phenylalanin*. Aus Hippursäure über Azlacton nach *Erlenmeyer*<sup>34</sup>. Farblose Blättchen, Schmp. 273° (Zers.). Ausbeute 90 bis 100% d. Lit.

2. *D- und L-Phenylalanin*. Durch Racematspaltung des N-Formyl-DL-phenylalanin-brucinsalzes nach *W. Schoeller* und *E. Fischer*<sup>35</sup>. Ausbeute aus 50 g DL-Phenylalanin: 8 bis 10 g D-Phenylalanin,  $[\alpha]_D^{20} = + 35$  bis 36° ( $\pm 0,5^\circ$ ); 4 bis 6 g L-Phenylalanin,  $[\alpha]_D^{20} = - 34$  bis 34,5° ( $\pm 0,5^\circ$ ).

3. *DL-Glutaminsäure*<sup>36</sup>. Aus 75 g L-Glutaminsäure mit Ba(OH)<sub>2</sub> im Autoklaven bei 160 bis 170° wurden 40 bis 45 g DL-Glutaminsäure vom Schmp. 198° erhalten.

4. *L- und DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester*<sup>5</sup>. Aus 37 g L- bzw. DL-Glutaminsäure in Methanol und Acetylchlorid 22 bis 24 g L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester, Schmp. 182° bzw. DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester, Schmp. 170 bis 171°.

5. *L- und DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester*. Aus 15 g L-Glutaminsäure in Benzylalkohol mit Jodwasserstoffsäure 7,5 bis 8,5 g L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester, Schmp. 174 bis 175°. Lit.: 169 bis 170°<sup>5</sup> und 174°<sup>37</sup>.

DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester<sup>3</sup> wurde nach dem gleichen Verfahren hergestellt, Schmp. 172 bis 174°.

6. Nach dem Phosgenverfahren von *A. C. Farthing* und *R. J. Reynold*<sup>3, 38</sup> wurden folgende NCA dargestellt:

<sup>33</sup> *W. J. Le Quesne* und *G. T. Young*, *J. Chem. Soc. London* **1954**, 1950.

<sup>34</sup> *E. Erlenmeyer*, *Org. Synth.* **14**, 82.

<sup>35</sup> *E. Fischer* und *W. Schoeller*, *Ann. Chem.* **357**, 1 (1907).

<sup>36</sup> *E. Fischer*, *Ann. Chem.* **365**, 183 (1909).

<sup>37</sup> *E. R. Blout*, *P. Doty* und Mitarb., *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 941, 947, 955 (1956).

D-Phenylalanin-NCA, Schmp. 91 bis 92°, L-Phenylalanin-NCA, Schmp. 90 bis 91°, DL-Phenylalanin-NCA, Schmp. 127 bis 128°, L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-NCA, Schmp. 98°, DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-NCA, Schmp. 70 bis 72°, L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester-NCA, Schmp. 96 bis 97°, DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester-NCA, Schmp. 62 bis 63°.

7. *Mesoporphyrinhydrasid*. Aus Hämin<sup>3, 39</sup> über Protoporphyrin<sup>40</sup>, Mesoporphyrin-IX-dimethylester und Umsetzung mit Hydrazin zum Mesoporphyrin-IX-dihydrasid<sup>41</sup>; Schmp. > 300°.

8. *Mesohämin*<sup>40</sup>. Mesohämin wurde aus dem Mesoporphyrin mit Eisen-II-acetat in Eisessig-Ameisensäure in Anwesenheit von Cl-Ionen gewonnen. Nach Umkristallisation aus wenig Eisessig-Ameisensäure zeigte das Produkt einen Eisengehalt von 8,31%; 8,26%. Ber.: 8,51% (vgl. exper. Teil I, 10).

9. *Synthese der Polyglutaminsäure- $\gamma$ -methyl- bzw. - $\gamma$ -benzylester, der Polyphenylalanin-glutaminsäure- $\gamma$ -methyl- bzw. - $\gamma$ -benzylester sowie der entsprechenden mesoporphyrin-substituierten Polypeptide (inaktive und aktive Formen)* (vgl. Anm. 3). Jeweils 1 g der NCA (bei den Copolymeren die Mischung der NCA in den Molverhältnissen 2 : 1, 1,5 : 1, 1 : 1, 0,5 : 1, 0,25 : 1, 0 : 1) wurde in 20 ccm Nitrobenzol (mit KOH gekocht, über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet, im Vak. destilliert) gelöst. Von einer Initiatorlösung Nitrobenzol zu Methanol = 95 : 5 wurden 0,5 ccm zugesetzt. Bei der Synthese der Fermentmodelle diente das Mesoporphyrindihydrasid, das im Molverhältnis 1 : 100 zugesetzt wurde (der Farbstoff muß zuerst in Nitrobenzol gelöst werden), als Initiator. Die Nitrobenzollösung der Anhydride wurde 4 bis 6 Tage bei 65 bis 70° belassen. Nach dieser Zeit entstand meistens eine Gallerte, in einigen Fällen eine hochviskose Lösung. Die auspolymerisierte Lösung wurde mit Petroläther versetzt, mehrfach dekantiert und der entstandene Niederschlag über Nacht unter Methanol aufbewahrt. Da das Nitrobenzol sehr hartnäckig am Polypeptid haftet, wurden die Polyester mit einem Benzol-Methanol-Gemisch extrahiert. Nach 30 bis 45 Min. waren die Substanzen im allgemeinen geruchlos. Sie wurden im Vak. oder bei 30 bis 35° getrocknet. Die mit einer Wirkungsgruppe substituierten Polypeptide sind stark lichtempfindlich, so daß es ratsam erschien, sie nur in Form der entsprechenden Mesohämin-polypeptidester aufzubewahren. Die Polypeptidester fallen mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten an, Poly- $\gamma$ -methylester mit 38 bis 90%, die Poly- $\gamma$ -benzylester mit 46 bis 86%. Die schwankenden Ausbeuten erklären sich durch die verschiedenen starke Lösung niedermolekularer Anteile während der Behandlung mit Methanol.

10. *Herstellung der Mesohäminpolypeptidester*. Die Eiseneinführung findet bei 90° in einer Eisessiglösung mit Fe-II-acetat statt. Farbumschlag nach Braun. Die Lösung wurde 2 bis 3 Min. in gelindem Sieden gehalten und anschließend 1 bis 2 Stdn. bei Zimmertemp. aufbewahrt, wobei sie zu einer Gallerte erstarrte. Nach Verdünnen mit Wasser wurde filtriert bzw. zentrifugiert, bis zur negativen Rhodanidreaktion gewaschen und wie unter Nr. 9 weiterbehandelt.

11. *Verseifung der Polypeptid- bzw. Mesohäminpolypeptidmethylester*. 0,75 g der optisch-aktiven Polypeptidester wurden mit 1 bis 2 ccm Dioxan benetzt, mit einer Lösung von 0,75 g Kupfersulfat in 3 bis 5 ccm H<sub>2</sub>O ver-

<sup>38</sup> A. C. Farthing und R. J. W. Reynold, Nature **165**, 647 (1950).

<sup>39</sup> Siehe bei N. Nenki und J. Zaleski, Z. physiol. Chem. **30**, 390 (1900).

<sup>40</sup> H. Fischer und B. Pützer, Z. physiol. Chem. **154**, 39 (1926).

<sup>41</sup> H. Fischer, E. Haarer und F. Stadler, Z. physiol. Chem. **241**, 209 (1936).

— H. Fischer, Chemie des Pyrrols II. Leipzig. 1937.



setzt und nach Zugabe von 30 ccm 0,5 n NaOH 5 Stdn. bei 50° aufbewahrt. Nach Filtration vom entstandenen CuO und Cu(OH)<sub>2</sub> wurde die tiefblaue Lösung mit HCl schwach angesäuert und die ausgefallenen weißen bzw. braunen flockigen Niederschläge durch Zentrifugieren und Waschen von Cu<sup>++</sup>- und H<sup>+</sup>-Ionen befreit. Auf diese Weise wurden Modelle aus folgenden Komponenten gewonnen: L-L; D-L; L-DL; D-DL. Bei den inaktiven Substanzen unterblieb der Kupfersulfatzusatz; das Modell im Molverhältnis 1,5:1 wurde mit 1 n NaOH 7 Stdn. bei 50° behandelt. Höhere Molverhältnisse wurden nicht weiter verarbeitet, da z. B. bei dem H-(Phe-Glu)<sub>n</sub>-OH 2:1 erst nach 8 Stdn. bei 90 bis 95° Lösung eintritt, während H-(Phe-Glu)<sub>n</sub>-OH 3:1 einen beträchtlichen Rückstand hinterläßt. Die Verseifung der Methyl-ester folgt mit 42 bis 95% Ausbeute; die unterschiedlichen Ausbeuten beruhen auf der durch Trocknung bedingten verschiedenen physikalischen Beschaffenheit der Polyester. Die Polypeptide sind löslich in Pyridin, Eisessig und Dimethylformamid.

Zur weiteren Reinigung wurden die Peptidsäuren in NaHCO<sub>3</sub> gelöst, 2 bis 4 Tage gegen dest. Wasser unter Verwendung einer Cellophanmembran dialysiert, mit verd. HCl gefällt, neutral zentrifugiert, getrocknet, 1 bis 2 Stdn. mit warmem Methanol, 1 bis 2 Stdn. mit Äther extrahiert und nochmals im Vak. getrocknet.

12. *Ermittlung der Verseifungsbedingungen des Poly-L-glutaminsäure-γ-methylesters* (OCH<sub>3</sub> ber.: 21,68%) mit 0,5 n NaOH in Anwesenheit von frisch gefälltem Cu(OH)<sub>2</sub>. 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> bzw. 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stdn. bei 20°, gef.: OCH<sub>3</sub> 16,15% bzw. 0,1%; 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> bzw. 5 Stdn. bei 50°, gef.: OCH<sub>3</sub> 8,35% bzw. 0,5%.

	+ α	+ [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	Mittelwert
L-H-Glu-OH (nicht mit HBr gekocht)	0,640	30,05	+ 30,05°
	0,640	30,05	
L-H-Glu-OH (mit HBr gekocht)	0,560	26,3	+ 27,3°
	0,586	27	
	0,598	28,1	
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH (7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Stdn. 20° ohne Cu)	0,618	25,4	+ 25°
	0,593	24,4	
	0,612	25,3	
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH (7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Stdn. 20° mit Cu)	0,610	25,2	+ 25,4°
	0,607	25,1	
	0,629	25,9	
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH (5 Stdn. 50° ohne Cu)	0,555	22,9	+ 22,9°
	0,570	23,6	
	0,540	22,3	
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH (5 Stdn. 50° mit Cu)	0,650	26,8	+ 26,7°
	0,647	26,7	
	0,643	26,6	
H-(L-Glu) <sub>n</sub> -OH (5 Stdn. 70° mit Cu)	0,446	18,4	+ 19,6°
	0,510	21,0	
	0,470	19,4	

Zur Bestimmung von  $[\alpha]_D^{20}$  wurden jeweils 3 Proben  $7\frac{1}{2}$  Stdn. bei  $20^\circ$  mit und ohne Kupfersulfatzusatz, 5 Stdn. bei  $50^\circ$  mit und ohne Kupfersulfatzusatz, 5 Stdn. bei  $70^\circ$  mit Kupfersulfatzusatz verseift. Jeweils 266 mg der erhaltenen H-(L-Glu)<sub>n</sub>-OH wurden mit 10 ccm HBr (48%ig) 6 Stdn. auf dem Drahtnetz hydrolysiert, mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und im 2-dm-Rohr gemessen. (Siehe S. 448.)

Die Ansätze ergaben 85 bis 96% Ausbeute, die Proben 5 Stdn.  $50^\circ$  und  $7\frac{1}{2}$  Stdn.  $20^\circ$  hatten 96% freie Carboxylgruppen (titriert gegen Phenolphthalein).

13. *Hydrazinverfahren.* a) 1,8 g Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester wurden 2 Stdn. auf dem Wasserbad bei 60 bis  $70^\circ$  mit Hydrazinhydrat behandelt. Nach Entfernung des Hydrazins im Vak. und Waschen mit Äther verblieben 1,6 g (80% d. Th.)  $(C_5H_9O_2N_3)_n$  (143,15).

Ber. C 41,95, H 6,34, N 29,36, OCH<sub>3</sub> —  
Gef. C 39,15, 39,00, H 6,45, 6,61, N 27,75, 27,55, OCH<sub>3</sub> 0,85, 0,84.

b) 2,74 g L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-NCA wurden in 14 ccm Dioxan polymerisiert (Methanol als Initiator) und zu der auspolymerisierten Lösung 10 ccm Hydrazinhydrat hinzugesetzt. Nach 2 Stdn. bei 50 bis  $60^\circ$  wurde mit Äther gefällt, gewaschen und über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Vak. getrocknet. Man erhält eine fast vollständige Umwandlung in das Hydrazid.

$(C_5H_9O_2N_3)_n$  (143,15).

Ber. C 41,95, H 6,34, N 29,36, OCH<sub>3</sub> —  
Gef. C 38,65, 38,40, H 6,76, 6,86, N 29,15, 28,85, OCH<sub>3</sub> 0,24, 0,24.

c) In einem dritten Versuch wurde der isolierte Poly-DL-phenylalanin-DL-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester, wie unter 14 a beschrieben, in das Hydrazid übergeführt.

$(C_{14}H_{18}O_2N_4)_n$  (290,32)<sub>n</sub>.

Ber. C 57,92, H 6,25, N 19,30, OCH<sub>3</sub> —  
Gef. C 54,65, H 6,42, H 16,95, 17,10, OCH<sub>3</sub> 0,35, 0,36.

Das unter 13 a hergestellte Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -hydrazid wurde mit 7 n HCl 20 Min. bei  $85^\circ$  hydrolysiert. Nach kurzer Zeit beginnt die Ausscheidung der Poly-L-glutaminsäure (65% d. Th.). Titration gegen Phenolphthalein ergab 96% freie Carboxylgruppen. Das Produkt zeigt im *Kofler* einen scharfen Schmp. von 244 bis  $246^\circ$ . Die aus dem Methylester mit 0,5 n NaOH + Cu(OH)<sub>2</sub> hergestellte Poly-L-glutaminsäure hat im *Kofler* einen Schmp. von 246 bis  $249^\circ$ .

Versuche, die Hydrazinmethode auf die Mesoporphyrin- bzw. Mesohämin-polypeptide anzuwenden, waren erfolglos.

#### 14. Verseifung der Polypeptidbenzylester mit HBr-Eisessig.

a) 266 mg L-Glutaminsäure in 10 ccm Wasser gelöst, 10 ccm 48% HBr, 2 ccm HBr-Eisessig zugefügt und mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt.  $[\alpha]_D^{20} = 29,3^\circ$ .

b) 373 mg L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester (dies entspricht 266 mg L-Glutaminsäure) werden wie unter a behandelt.  $[\alpha]_D^{20} = 23,45^\circ$ .

c) 373 mg L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester werden 45 Min. mit 2 ccm HBr-Eisessig bei  $50^\circ$  behandelt, wie unter a mit HBr und Wasser auf 25 ccm

aufgefüllt. Die Lösung war durch feine Öltröpfchen von Benzylbromid getrübt, welche mit Äther ausgeschüttelt wurden. Die Drehung ergab bei 3 Proben einen mittleren Wert von  $[\alpha]_D^{20} = 28,4^\circ$ .

d) 250 mg Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester 45 Min. bei  $50^\circ$  mit HBr-Eisessig behandelt (vollständige Lösung), mit Äther die Polysäure ausgefällt, filtriert, mit Äther gewaschen und aus  $\text{NaHCO}_3$ -HCl umgefällt. Nach dem Trocknen verbleiben 116,5 mg (80% d. Th.). Zur Bestimmung der Drehung wurde mit 10 ccm HBr 6 Stdn. gekocht:  $[\alpha]_D^{20} = 26,2^\circ$ . Dies entspricht einem Drehungsabfall von  $0,9^\circ$ , wenn man den Abfall der Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = 30^\circ$  auf  $[\alpha]_D^{20} = 27,1^\circ$  beim 6stünd. Kochen mit 48%iger HBr berücksichtigt. Bei der Poly-L-glutaminsäure konnten 94% freie Carboxylgruppen nachgewiesen werden.

Bei Mesoporphyrinpolypeptiden wird der Farbstoff durch HBr-Eisessig abgespalten, bei Mesohäminpolypeptiden dagegen wird das Fe aus dem Komplex teilweise entfernt, und es treten im Spektrum die 4 Porphyrinbanden bei 500, 530, 565 und 624  $m\mu$  auf. Erneute Eiseneinführung ergibt wieder das Mesohäminpolypeptid (Hämochromogenspektrum).

Nach der HBr-Eisessigmethode wurden Poly-(phenylalanin-glutaminsäure) und Mesohämin-poly-(phenylalanin-glutaminsäure) aus den Kombinationen L-L, D-L und DL-L hergestellt.

15. *HBr-Nitrobenzol-Verfahren.* Der Poly-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester wurde in Nitrobenzol gelöst bzw. aufgeschlämmt und bei 60 bis  $70^\circ$  2 Stdn. HBr durchgeleitet — da bei copolymeren Polypeptidestern Lösungsschwierigkeiten eintraten, wurde der Ester nicht isoliert, sondern in die auspolymerisierte Lösung direkt HBr eingeleitet —, mit Äther-Petroläther gefällt, zentrifugiert, das Nitrobenzol entfernt und 2mal aus  $\text{NaHCO}_3$ -HCl umgefällt. Die Poly-L-glutaminsäure (51% d. Th.) hat 94% freie Carboxylgruppen und zeigt nach Hydrolyse mit HBr  $[\alpha]_D^{20} = 26,2^\circ$ .

16. *Bestimmung des Eisengehaltes der Mesohäminpolypeptide* erfolgte durch Aufnahme der Hämochromogenspektren und Vergleich mit dem monomeren Mesohämin (Substanzen jeweils in 7,5 ccm Phosphatpuffer pH = 7,3 + 2,5 ccm Pyridin gelöst und mit Natriumdithionit reduziert). Es wurden jeweils zwei Eisenbestimmungen durchgeführt und in einigen Fällen die erhaltenen Werte durch die kolorimetrische Eisenbestimmung überprüft (*Lange-Kolorimeter*, Modell VI, Grünfilter, Schichtdicke der Küvette 2,997 cm).

*Spektrophotometrische Fe-Bestimmung* [Beispiel: Mesohämin-poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäure) (1:4), vgl. Tabelle 3].

Mesohämin-Einwaage: 0,3 mg/10 ccm.

Fermentmodell-Einwaage: 3,03 mg/10 ccm;  $d = 0,5$  cm.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d, \quad \varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}, \quad E_{518} = 0,266 \text{ für Peptid,}$$

$$\varepsilon_{518} = \frac{0,423}{0,46 \cdot 0,5} \cdot 10^5 = 1,84 \cdot 10^5; \quad E_{547} = 0,370 \text{ für Peptid,}$$

$$\varepsilon_{547} = \frac{0,681}{0,46 \cdot 0,5} \cdot 10^5 = 2,96 \cdot 10^5,$$

$$\left. \begin{aligned} c_{518} &= \frac{0,266}{1,84 \cdot 0,5} \cdot 10^{-5} = 0,289 \cdot 10^{-5} \\ c_{547} &= \frac{0,370}{2,96 \cdot 0,5} \cdot 10^{-5} = 0,250 \cdot 10^{-5} \end{aligned} \right\} = 0,269 \cdot 10^{-5},$$

$$c = 2,69 \cdot 56 \cdot 10^{-6} = 151 \cdot 10^{-6} \text{ mg Fe/l,}$$

$$0,303 \text{ g Peptid} = 0,151 \text{ mg Fe,}$$

$$1 \text{ mg Peptid} = 4,98 \gamma \text{ Fe.}$$

Zur *kolorimetrischen Bestimmung* wurden 25 mg der Substanz in 0,25 ccm konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 1 ccm  $\text{H}_2\text{O}_2$  zerstört, zur Entfernung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 Min. erhitzt, mit Aqua dest. verdünnt und gegen Phenolphthalein neutralisiert. Nach Zugabe von 2 ccm einer 2%igen Na-Acetatlösung und 2 ccm einer Dithionitlösung (200 mg in 40 ccm 2%iger Natriumacetatlösung) sowie 1 ccm  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyllösung (250 mg in 50 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ ) erfolgte nach 30 Min. die Bestimmung der Absorption. Als Vergleich diente eine ebenso behandelte Lösung ohne Modellsubstanz. Die Eichkurve wurde mit *Mohrschem Salz* hergestellt.

Der Fe-Gehalt der Fermentmodelle ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

17. Auf eine Wiedergabe der *Spektren* wird in dieser Arbeit verzichtet, da diese bereits in<sup>3</sup> mit einer ausführlichen Diskussion erfolgte. Die Lage der charakteristischen Hämochromogenbanden bei 518 und 547  $m\mu$  wurde bei den Eisenbestimmungen ermittelt.

18. *Synthese der Mesohämin-poly-L-tyrosin-L-glutaminsäure* 1:1, des unsubstituierten Peptides und des Poly-L-tyrosins.

O-Acetyl-L-tyrosin wurde aus dem L-Tyrosin (Ausbeute 54% d. Th.) erhalten, Schmp. 213 bis 215° (Lit.: 54% d. Th., Schmp. 213 bis 215°).

Durch Phosgenisierung des O-Acetyl-L-tyrosins in Dioxan war das O-Acetyl-L-tyrosin-NCA mit 77% d. Th., Schmp. 120 bis 124° erhältlich. Lit.: 90% d. Th., Schmp. 122 bis 123°. *J. L. Bailey*<sup>42</sup> gibt 120° an.

O-Acetyl-L-tyrosin-NCA, O-Acetyl-L-tyrosin-NCA + L-Glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-NCA 1:1 (und mit Zusatz von Mesohämindihydrasid 1:100) wurden, wie unter 10 beschrieben, in Nitrobenzol polykondensiert und die entstandenen hochviskosen Lösungen wie üblich aufgearbeitet. Die Polypeptide sind schwach gelbliche Pulver, Ausbeuten:

Poly-(O-acetyl-L-tyrosin): 67% (Lit.: 88%),

Poly-(O-acetyl-L-tyrosin-L-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester) 62,5%,

Mesoporphyrin-poly-(O-acetyl-L-tyrosin-L-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester) 57,5%.

Die Eiseneinführung erfolgte wie üblich und die Polypeptide wurden dann 5 Stdn. bei 50° +  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  verseift: H-(L-Tyr-L-Glu)<sub>n</sub>-OH nach Dialyse und Extraktion mit Methanol (Ausbeute von 64% d. Th.).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38^\circ$  (1 dm,  $c = 1$ ), Mesohämin-H-(L-Tyr-L-Glu)<sub>n</sub>-OH 67% d. Th. (braunes Pulver).

Das Poly-(O-acetyl-L-tyrosin) wurde 45 Min. mit 0,5 n NaOH bei 20° verseift, da nach 15 Min. ein großer Teil noch ungelöst war. Schwach gelbliches Pulver, 77% d. Th. (Lit.: 76% d. Th.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 17,2^\circ$  ( $\alpha = 0,32^\circ$ , 1 dm,  $c = 0,928$  in n NaOH), Drehung identisch mit<sup>43</sup>.

Ferner wurde das O-Acetyl-L-tyrosin 5 Stdn. bei 50° +  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  verseift, um festzustellen, ob eine Drehungsdifferenz eintritt:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 16,7^\circ \quad (\alpha = 0,31^\circ, 1 \text{ dm}, c = 0,928 \text{ in n NaOH}).$$

<sup>42</sup> *J. L. Bailey*, *J. Chem. Soc. London* 1950, 3461.

<sup>43</sup> *K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich*, *Mh. Chem.* 84, 705 (1953).

## II. Endgruppen und Aminosäuresequenzen

## 1. DNP-Verfahren

a) *DNP-Polypeptide*. 0,075 g der H-(DL-Phe-DL-Glu)<sub>n</sub>-OH im Molverhältnis 2 : 1, 1 : 1, 0,5 : 1 und der Mesohämin-H-(DL-Phe-DL-Glu)<sub>n</sub>-OH 1 : 1 und 0,5 : 1 wurden in 4 ccm Wasser + 0,1 g NaHCO<sub>3</sub> und 1,5 ccm Dimethylformamid gelöst und 0,1 g DNFB in 1,5 ccm Alkohol zugesetzt. Nach 6 Stdn. auf der Schüttelmaschine wurde mehrfach ausgeäthert und auf pH = 4 angesäuert; die ausgefallenen DNP-Polypeptide wurden dann 3 bis 4 Stdn. mit Äther zur Entfernung von überschüssigem DNFB und Dinitrophenol extrahiert, mit Essigsäure auf pH = 4 angesäuert und zentrifugiert. Ausbeute 0,035 bis 0,055 g. Die DNP-Polypeptide der unsubstituierten Modelle stellen gelb gefärbte Pulver dar, die bei 225 bis 230° (*Kofler*) erweichen.

b) *DNP-DL-Phenylalanin*. Das DNP-Phe-OH wurde mit 45,5% d. Th. erhalten. Schmp. 207 bis 208°. Lit.:<sup>44</sup> Schmp. 204 bis 206°.

c) *DNP-DL-Glutaminsäure*. Die DNP-DL-Glutaminsäure wurde nach zweimaligem Umfällen aus Äther-Petroläther und Umkristallisation aus Äther-Benzol mit einem Schmp. 155 bis 159° (*Kofler*) erhalten. (Nach *F. Green*<sup>44</sup> Schmp. 155 bis 162°, nach *K. R. Rao* und *H. A. Sober*<sup>45</sup> Schmp. 148 bis 149°).

d) *DNP-L-Glutaminsäure*. Nach *A. L. Levy* und *D. Chung*<sup>46</sup> bzw. *S. G. Waley*<sup>47</sup> in 68%iger Ausbeute. Der Schmp. unseres Präparats lag jedoch bei 112 bis 114° und konnte durch weitere Reinigung nicht verändert werden (nach *A. L. Levy* Schmp. 134 bis 136°, nach *S. G. Waley* Schmp. 93,5 bis 94,5°). Es hat den gleichen *R<sub>F</sub>*-Wert wie der DL-Körper.

e) *Hydrolyse der DNP-Verbindungen*. 1,5 mg der DNP-Aminosäure bzw. 4 bis 6 mg der DNP-Polypeptide wurden mit 0,5 ccm HBr (48%ig) 24 Stdn. bei 100° der Hydrolyse im geschlossenen Rohr unterworfen. Nach Verdünnung auf 1 ccm wurde mehrfach mit Äther extrahiert und die Ätherlösung auf mit Phthalatpuffer pH = 6 getränktem Schleicher- und Schüll-Papier 2043 bm chromatographiert. Als Lösungsmittel diente tertiärer Amylalkohol, der 8 Stdn. mit Phthalatpuffer geschüttelt wurde. Laufzeit 14 bis 16 Stdn. (absteigend).

## 2. Hydrazinolyse (C-endständige Aminosäuren)

10 mg des Poly-DL-(phenylalanin-glutaminsäure- $\gamma$ -methylesters) im Molverhältnis 2 : 1, 1 : 1, 0,5 : 1, 0 : 1, 1 : 1 und 4 mg Phenylalanin und Glutaminsäure wurden 12 Stdn. bei 100°, 24 Stdn. bei 100° und 12 Stdn. bei 150° im geschlossenen Rohr mit 1 ccm Hydrazinhydrat behandelt. Bis auf eine leichte Trübung des Modelles 2 : 1 waren alle Proben klar gelöst. Nach Entfernung des Hydrazins im Vak. über Schwefelsäure wurde mit 1 ccm Wasser aufgenommen, mit 4 Tropfen Benzaldehyd erwärmt, 12 Stdn. stehen gelassen, filtriert, ausgeäthert, die wäsr. Lösung auf 0,5 ccm eingedampft und chromatographiert: 1. Schleicher und Schüll 2043 bm acetyliert, Butanol : Eisessig : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 1; 11 bis 12 Stdn. Laufzeit (absteigend). 2. Schleicher und Schüll 2043 bm Methyläthylketon : Pyridin : Wasser = 4 : 2 : 2; 5 Stdn. Laufzeit (absteigend).

<sup>44</sup> *F. Ch. Green*, *Analyt. Chemistry* **24**, 726 (1952).

<sup>45</sup> *K. R. Rao* und *H. A. Sober*, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 1328 (1954).

<sup>46</sup> *A. L. Levy* und *D. Chung*, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 2899 (1955).

<sup>47</sup> *S. G. Waley*, *J. Chem. Soc. London* **1955**, 517.

3. *Partialhydrolyse*

a) *Peptide*. 3 mg der Peptide wurden mit 2 ccm HCl konz. im geschlossenen Rohr bei 50° hydrolysiert und nach 2, 4 und 6 Tagen je 0,5 ccm abgenommen. Nach Entfernung der HCl über  $P_2O_5/KOH$  im Vak. wurde mit 0,25 ccm Wasser aufgenommen, filtriert und chromatographiert.

b) *Polypeptide*. 10 mg der Polypeptide wurden 0,1 n NaOH gelöst (Modell 2 : 1 in 0,2 ccm; Modell 1 : 1 in 0,3 ccm; pH = 7 bis 8). Nach Zugabe von 2 ccm HCl konz. bzw. 2 ccm 9%iger HCl wurde bei 37° und 50° bzw. bei 100° hydrolysiert und wie unter a) Proben entnommen und chromatographiert. Schleicher und Schüll 2043 bm Methyläthylketon : Pyridin : Wasser 4 : 2 : 2; Laufzeit 4 bis 5 Stdn. (absteigend). Methyläthylketon der Fa. Riedel de Haen, Sdp. 79,5 bis 81,5°; Pyridin über KOH gekocht, Sdp. 115,5°.

## III. Messung der katalytischen Eigenschaften

a) *Substrate: Tetrachlorsalicoin und Derivate*

1. *Zn-Staub-Eisessig-Reduktion*. 1,9 g Tetrachlorsalicyl wurden in Eisessig gelöst, in der Siedehitze ein Überschuß Zn-Staub zugesetzt und 5 Min. schwach erhitzt, die fast entfärbte Lösung vom Zink abfiltriert und in Wasser gegossen; weißer, zunächst klebriger Niederschlag, der in der Kälte fest wurde. Nach Filtrieren und Trocknen erhielt man durch zweimaliges Umkristallisieren aus Benzol-Ligroin 1,2 g (63% d. Th.), Schmp. 154 bis 156°; 156 bis 158° (*Kofler*).

2. *Hydrierung mit  $PtO_2$  in Eisessig*. 800 mg Tetrachlorsalicil wurden in 50 ccm Eisessig bei 65 bis 75° mit  $PtO_2$  als Katalysator hydriert. Nach 2 Stdn. waren 50 ccm  $H_2$  (theor.) verbraucht. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde in ausgekochtes Wasser gegeben und der in der Kälte festwerdende Niederschlag aus Ligroin umkristallisiert. 410 mg (51% d. Th.), Schmp. 155 bis 157°.

3. *Hydrierung mit Pd*. 3 g Tetrachlorsalicil in 250 ccm Eisessig, 150 ccm Dioxan wurden mit Pd als Katalysator hydriert. Nachdem die Lösung annähernd entfärbt war, wurde wie unter 1) aufgearbeitet. 2,1 g (68% d. Th.), Schmp. 154 bis 156°.

$C_{14}H_8O_4Cl_4$  (382,03). Ber. Cl 37,13. Gef. Cl 37,66, 37,76.

4. *Osazon*. Tetrachlorsalicil bzw. -salicoin wurden in Eisessig-Dioxan gelöst, mit Phenylhydrazin versetzt und einige Minuten erhitzt. Beim Abkühlen gelbe Kristalle, die zweimal aus Dioxan umkristallisiert wurden.

Osazon aus Tetrachlorsalicil, Schmp. 264 bis 266° (*Kofler*),

Osazon aus Tetrachlorsalicoin, Schmp. 263 bis 266° (*Kofler*), keine Schmp.-Depression der Mischung.

$C_{26}H_{18}O_2N_4Cl_4$  (560,264). Ber. Cl 25,32. Gef. Cl 25,70, 25,82.

5. *Acetate*. a) Tetrachlorsalicil wurde in Dioxan + Pyridin mit Acetanhydrid versetzt und 20 bis 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser weißer, klebriger Niederschlag, der nach einigen Stdn. bei - 5° fest wurde. Aus Alkohol Schmp. 152 bis 154° (Lit.: 152 bis 153°).

b) Analog wurde das Tetrachlorsalicoin behandelt. Das Triacetat kristallisiert aus Alkohol in kleinen Stäbchen vom Schmp. 176 bis 178°.

$C_{20}H_{14}O_7Cl_4$  (508,14). Ber. Cl 27,91. Gef. Cl 27,51, 27,25.

## b) Messungen

Die Messung des Sauerstoffverbrauches wurde in der *Warburg*-Apparatur bei 20° C durchgeführt. Jedes Gefäß enthielt immer 6 ccm: 4,8 ccm Phosphatpuffer pH = 7,3, 1 ccm Lösung der Modellsubstanzen und 0,2 ccm Pyridin.

Die Substrate wurden wie folgt zugesetzt: p-Phenylendiamin, 4,8 ccm einer Lösung von 0,4527 g in 50 ccm Puffer,

10 mg L-(D)-Adrenalin (fest),

5 mg Tetrachlorsalicyol in 0,2 ccm Pyridin,

10 mg Furoin in 0,2 ccm, 10 mg Pyridin in 0,2 ccm Pyridin.

Von den übrigen Benzolderivaten 10 mg in 0,2 ccm Pyridin.

## IV. Synthese der Di- und Tripeptide

## 1. DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin

a) Nach F. Wessely<sup>31</sup> mit Hilfe der Azidmethode. Phenylalaninäthylesterhydrochlorid: 78 bis 87% d. Th., umkristallisiert aus Essigester, Schmp. 126 bis 128° (Lit.: 127°).

N-Cbo-DL-Phenylalaninäthylester: 80 bis 84% d. Th., Schmp. 77 bis 80°; Lit.: 74% d. Th., Schmp. 77 bis 79° (Kofler).

N-Cbo-DL-Phenylalaninhydrazid: 88 bis 92% d. Th., Schmp. 135 bis 137°; Lit.: 92% d. Th., Schmp. 136 bis 138° (Kofler).

N-Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalaninäthylester:

84 bis 90% d. Th., Schmelzbereich 84 bis 93°; mit 82% d. Th. kein ausgeprägter Schmp. nach (Lit.-Angabe).

N-Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin: 80% d. Th., Schmp. 135 bis 138°; 80% d. Th., Schmp. 138 bis 140° (Kofler).

DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin. 5,51 g Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin wurden mit 16,5 g HBr-Eisessig (36%ig) versetzt und 20 Min. bei Zimmertemp. geschüttelt. Nach Zusatz von 250 ccm Äther erhielt man ein Öl, das bald erstarrte. Abgesaugt mit Äther, Aceton und Essigester gewaschen, verblieben 4,42 g (91% d. Th.) Hydrobromid, Schmp. 213 bis 218°. Durch erneutes Lösen in Alkohol und wenig Essigester kristallisierte das Hydrobromid mit einem Schmp. von 216 bis 218° aus (Lit.: 218 bis 220°). Es verblieben 4 g (82,5% d. Th.).

4 g des Hydrobromids wurden in wenig Wasser gelöst und mit einer gesättigten Na-Acetatlösung versetzt, wobei sofort das freie DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin in kleinen Nadelchen ausfiel. 2,64 g (83% d. Th.). Schmp. 283 bis 286° (Kofler) (Lit.: 283 bis 285°).

b) Anhydridmethode nach Boissonnas. 1,196 g Cbo-DL-Phenylalanin wurden in 10 ccm Dioxan gelöst, 1 ccm Tri-n-butylamin, 0,4 ccm Chlorameisensäure-äthylester hinzugefügt und mit einer Lösung von 1,207 g DL-Phenylalanin-äthylesterhydrochlorid (0,0052 Mol) in 10 ccm Dioxan + 1,15 ccm Tri-n-butylamin nach 10 Min. bei 5 bis 10° vereinigt (CO<sub>2</sub>-Entwicklung). Nach 1 Std. bei 5 bis 10° und 1 Std. bei Zimmertemp. wurde das Dioxan bei 40° im Vak. abgezogen, das entstandene Öl in Essigester aufgenommen, mit 1 n HCl, H<sub>2</sub>O, einer 1%igen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O geschüttelt und der Essigester im Vak. entfernt. Das schwach gelbliche Öl wurde aus Essigester umkristallisiert. 1,39 g, 74% d. Th., Schmp. 84 bis 93°.

Verseifung und Abspaltung der Cbo-Gruppe führte zum DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin vom angegebenen Schmp.

Die Boissonnassche Methode im wäbr. Medium verlief nur mit 30,5% Ausbeute. Das entstandene Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin war

schwierig von den Ausgangssubstanzen zu trennen und zeigte nur einen Schmp. von 112 bis 114°. Entfernung der Cbo-Gruppe mit HBr-Eisessig lieferte jedoch auch hier das Dipeptid vom Schmp. 283 bis 286°.

## 2. $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin<sup>33, 48</sup>

a) *Cbo-DL-Glutaminsäure*. Aus 13 g DL-Glutaminsäure wurden 18 g (72,5% d. Th.) Cbo-DL-Glutaminsäure erhalten, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester einen Schmp. von 121 bis 123° zeigte (Lit.: 122 bis 124°), bei weiteren Ansätzen betrug die Ausbeute bis zu 89,5%.

b) *Cbo-Glutaminsäureanhydrid*. 18 g Cbo-DL-Glutaminsäure wurden mit 50 ccm Acetanhydrid gelöst und 5 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Entfernung des Acetanhydrids im Vak. bei 60 bis 65° hinterblieb ein weißer Rückstand, der einige Tage über KOH und P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Vak. getrocknet wurde. Umkristallisation aus Chloroform ergab 15 g (89,5% d. Th., bei weiteren Ansätzen bis 95% d. Th.), Schmp. 109°.

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N (263,24). Ber. C 59,31, H 4,98, N 5,32.  
Gef. C 58,85, 58,90, H 4,08, 4,83, N 5,30, 5,15.

c) *Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalaninäthylester*. 14 g Phenylalaninäthylesterhydrochlorid wurden in 100 ccm H<sub>2</sub>O + 12,6 g NaHCO<sub>3</sub> gelöst, mit 100 ccm Essigester überschichtet, 15 g Cbo-DL-Glutaminsäureanhydrid in 100 ccm Essigester anteilweise zugesetzt und 6 Stdn. gerührt. Nach 24 Stdn. wurde die wäsr. Phase angesäuert, ausgeestert und die vereinigten Essigesterauszüge mit einer Sodalösung (4 Portionen, die je 0,6 g enthielten) extrahiert. Anschließend wurde mit einer 5%igen Sodalösung extrahiert, aus der sich nach Ansäuern mit 2 n HCl ein Öl abschied, das nach einiger Zeit erstarrte. Umkristallisation aus Essigester ergab 7,1 g (27,4% d. Th.) Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalaninäthylester. Kleine Nadeln vom Schmp. 126 bis 129°. Durch weiteres Umkristallisieren stieg der Schmp. auf 131 bis 133°. Bei weiteren Ansätzen konnte die Ausbeute bis zu 44% d. Th. erhöht werden.

C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> (456,48). Ber. C 63,14, H 6,18, N 6,14.  
Gef. C 63,55, 63,70, H 6,56, 6,41, N 6,05, 5,85.

d) *Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin*. 7,1 g des Esters wurden mit 40 ccm 1 n NaOH 1 Std. bei Zimmertemp. verseift (bereits nach kurzer Zeit geht der Ester in Lösung). Mit 2 n HCl wurde die freie Säure vorsichtig gefällt, wobei sich schmierige Kristalle abschieden. Der Niederschlag wurde in heißem Essigester gelöst und mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 24 Stdn. bei 0° und erneuter Petrolätherzugabe schieden sich 4,7 g (71% d. Th.) vom Schmp. 140 bis 148° ab. Durch Umkristallisation aus Wasser stieg der Schmp. auf 152 bis 154°; Schmp. (*Kofler*): 153 bis 155°, unlöslich in Benzol, CCl<sub>4</sub>, CHCl<sub>3</sub>, schwerlöslich in Essigester.

C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> (428,43). Ber. C 61,67, H 5,65, N 6,54.  
Gef. C 61,55, 61,30, H 5,55, 5,53, N 6,40, 6,30.

e)  *$\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin*. 8,5 g des Cbo-Derivates wurden in 20 ccm Wasser, 24 ccm Eisessig und 300 ccm Methanol mit Pd als Katalysator hydriert (nach einigen Stunden bereits Abscheidung weißer Kristalle). Nach zirka 48 Stdn. wurde durch Zusatz von Wasser das Peptid in Lösung gebracht,

<sup>48</sup> J. S. Fruton und M. Bergmann, J. Biol. Chem. 127, 627 (1939).



vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel im Vak. abgezogen und 3 g Dipeptid erhalten. Aus der Mutterlauge konnten nach weiterem Einengen und Alkoholzusatz noch 1,4 g gewonnen werden (insgesamt 75,5% d. Th.). Aus Wasser umkristallisiert, zeigt die Substanz einen Schmp. von 178 bis 180° (*Kofler*).

$C_{14}H_{18}O_5N_2$  (294,30). Ber. C 57,13      H 6,17      N 9,52  
Gef. C 57,00, 57,15    H 6,07, 6,00    N 9,55, 9,50

### 3. DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäure

a) *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäurediäthylester* (*Azidmethode*). 1,2 g Cbo-DL-Phenylalaninhydrazid wurden, wie bei *F. Wessely* beschrieben, in das Azid übergeführt und mit DL-Glutaminsäurediäthylester gekuppelt. Beim Abdampfen der ätherischen Lösung schied sich der Cbo-Dipeptidester bereits fest ab. Aus Alkohol-Wasser bzw. Essigester-Ligroin wurde umkristallisiert. Schmp. 85 bis 93°. Die Substanz bildet warzenförmige Aggregate, 1,2 g (64,5% d. Th.).

$C_{26}H_{32}O_7N_2$  (484,53). Ber.  $OC_2H_5$  18,61. Gef.  $OC_2H_5$  19,90.

b) *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäurediäthylester* (*Anhydridmethode*). 1,196 g (0,004 Mol) Cbo-DL-Phenylalanin wurden mit 1,27 g DL-Glutaminsäurediäthylester (0,0053 Mol) in der beim H-Phe-Phe-OH angegebenen Weise gekuppelt. Die anfallende leicht klebrige Kristallmasse wurde, wie unter a umkristallisiert, 1,54 g (79,5% d. Th.), Schmp. 85 bis 93°.

c) *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäure*. 1,62 g des Esters wurden in 8 ccm 1 n NaOH und Alkohol (12 ccm) 45 Min. bei Zimmertemp. verseift, von wenig Ungelöstem abfiltriert, bis zum Kongoumschlag angesäuert und das Lösungsmittel im Vak. abgezogen. Das erhaltene Öl erstarrte nach einiger Zeit und aus Essigester-Ligroin umkristallisiert verblieben 0,9 g (67% d. Th.). Kleine Nadeln, Schmp. 159 bis 163°.

$C_{22}H_{24}O_7N_2$  (428,43). Ber. N 6,54. Gef. N 6,75, 6,85.

d) *DL-Phenylalanyl-DL-glutaminsäure*. 2,2 g der Cbo-Verbindung wurden in der unter IV, 2, e beschriebenen Weise hydriert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vak. hinterblieb ein Öl, das nach einigen Tagen über  $P_2O_5/NaOH$  im Vak. erstarrte. Aus wenig Wasser umkristallisiert, wurden 1,2 g (79% d. Th.) vom Schmp. 233 bis 236° erhalten. Das Dipeptid hatte einen scharfen  $R_F$ -Wert von 0,26<sub>7</sub>. Bei der sauren Hydrolyse treten Phenylalanin und Glutaminsäure auf; Endgruppenbestimmung mit Hydrazin zeigte eindeutig Glutaminsäure.

### 4. DL-Glutamyl-DL-glutaminsäure

a) *Cbo-DL-Glutamyl-DL-glutaminsäurediäthylester*. 4,7 g Cbo-DL-Glutaminsäureanhydrid in 33 ccm Essigester wurden innerhalb von 5 Min. bei Zimmertemp. zu einer Mischung von 4,2 g  $NaHCO_3$  in 33 ccm Wasser und 4,7 g DL-Glutaminsäurediäthylesterhydrochlorid in 33 ccm Essigester gegeben und 5 bis 6 Stdn. gerührt. Nach 15 Stdn. Stehen wurde die Essigesterschicht abgetrennt, die wäbr. Schicht mit 2 n HCl angesäuert, dreimal mit 50 ccm Essigester ausgeschüttelt und alle Essigesterfraktionen vereinigt. Der im Essigester befindliche Cbo-Peptidester wurde mit einer 5%igen  $NaCO_3$ -Lösung extrahiert. Beim Ansäuern schied ein zähes Öl ab, das bald erstarrte. Aus Essigester-Ligroin konnten 2,7 g (32,4% d. Th.), bei einem weiteren

Ansatz 50% d. Th. vom Schmp. 126 bis 129° erhalten werden. Die Substanz läßt sich auch aus Wasser umkristallisieren.

$C_{22}H_{30}O_9N_2$  (466,48). Ber.  $OC_2H_5$  19,32. Gef.  $OC_2H_5$  19,85, 19,80.

b) *Cbo-DL-Glutamyl-DL-glutaminsäure*. 10 g des Diäthylesters wurden mit 50 ccm 1 n NaOH 25 Min. bei 20° verseift. Nach Ansäuern bis zum Kongoumschlag hinterblieb ein Öl (5,5 g = 62% d. Th.), das nicht fest erhalten werden konnte.

c) *DL-Glutamyl-DL-glutaminsäure*. 5 g der nicht kristallisierten Cbo-Verbindung wurden, wie unter IV, 2, e beschrieben, hydriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels konnte wiederum nur ein Öl gewonnen werden, das aber nach scharfem Trocknen über  $P_2O_5/KOH$  mit absol. Äther-Aceton fest wurde, so daß 2 g (59,5% d. Th.) als amorphes Pulver erhalten werden konnten. Das Dipeptid ist sehr hygroskopisch und zeigt keinen ausgeprägten Schmp., dagegen aber im Chromatogramm neben Glutaminsäure einen einheitlichen Fleck, der mit dem von L-Glutamyl-L-glutaminsäure vom Schmp. 184<sup>49</sup> identisch ist.

#### 5. *DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-DL-glutaminsäure*

a) *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-DL-glutaminsäurediäthylester*. 4,3 g Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin wurden in der bei IV, 1, b beschriebenen Weise mit 2,2 g DL-Glutaminsäurediäthylesterhydrochlorid zum Cbo-Tripeptidester gekuppelt. Das anfallende ölige Produkt wurde in Alkohol gelöst und mit Wasser bis zur Trübung versetzt, wobei nach einigem Stehen der Ester kristallisierte. Weißes Pulver, Schmp. 105 bis 107°; 4,6 g = 75,4% d. Th.

Der Cbo-Tripeptidester konnte auch nach der Azidmethode aus dem Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalaninhydrazid mit einer Ausbeute von 59% d. Th. erhalten werden. Schmp. 103 bis 108°.

b) 4,5 g des Cbo-Tripeptidesters wurden mit 100 ccm in NaOH und 70 ccm Alkohol 1 Std. bei Zimmertemp. verseift. Nach Ansäuern fiel ein gelbes Öl aus, aus dem nach Entfärbung mit Aktivkohle durch Umkristallisation mit Essigester-Ligroin 3 g Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-DL-glutaminsäure vom Schmp. 165 bis 175° gewonnen wurden. Durch weitere Reinigungsversuche vergrößerte sich der Schmelzbereich, die Hydrierung führte zu einem uneinheitlichen Stoffgemisch.

#### 6. *DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-L-glutaminsäure*

a) *Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-L-glutaminsäuredibenzylester*. Um die kritische Stufe der alkalischen Verseifung des Cbo-Tripeptidmethylesters zu umgehen, wurden 5,1 g Cbo-DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanin mit 4,4 g L-Glutaminsäuredibenzylester (Schmp. 100 bis 102°; Lit.:<sup>50</sup> 100 bis 102°) nach der Anhydridmethode, wie unter IV, 1, b beschrieben, gekuppelt. Die zunächst als Öl anfallende Substanz wurde aus Alkohol-Wasser als Pulver erhalten. 3 g = 34,9% d. Th., Schmp. 87 bis 89°; 88 bis 92° (*Kofler*).

b) *DL-Phenylalanyl-DL-phenylalanyl-L-glutaminsäure*. 2,6 g Cbo-Tripeptid-dibenzylester wurden in 200 ccm Methanol, 15 ccm Wasser und 15 ccm Eisessig mit  $Pd/H_2$  hydriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der

<sup>49</sup> M. Bergmann und L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932).

<sup>50</sup> E. Brand und H. Sachs, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4610 (1953).

ölige Rückstand beim Trocknen über  $P_2O_5/KOH$  fest. Durch Umfällung aus Alkohol-Äther ergaben sich 1 g (66,5% d. Th.) eines schwach gelben Pulvers, das durch Umlösen aus wenig Dimethylformamid weiß und durch anschließende Umkristallisation aus Wasser als Hydrat in kleinen Nadeln vom Schmp. 210 bis 212° (*Kofler*) erhalten wurde.

$C_{23}H_{27}O_6N_3 \cdot H_2O$  (459,49). Ber. C 60,12, H 6,36, N 9,15.  
Gef. C 60,70, 61,00, H 6,78, 6,75, N 8,55, 8,60.

#### 7. $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin

a) *Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalaninhydrazid*. 4,5 g *Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalaninäthylester* wurden in 20 ccm absol. Alkohol gelöst, mit 2 g Hydrazinhydrat versetzt, 30 Min. auf 50° erwärmt und nach 12 Stdn. bei 0° vorsichtig Petroläther zugegeben. Das Hydrazid kristallisiert in Nadeln vom Schmp. 181 bis 183° (*Kofler*). Es läßt sich aus Alkohol umkristallisieren. 4 g (90% d. Th.).

$C_{22}H_{26}O_6N_4$  (442,46). Ber. N 12,66. Gef. N 12,85,  $OC_2H_5$  0,5.

b) *Cbo- $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalaninäthylester*. 3,3 g des  $\alpha$ -Cbo-Dipeptidhydrazids wurden in 20 ccm Eisessig und 40 ccm 2 n HCl bei 5° mit  $NaNO_2$  in das Azid übergeführt, das mit Äther-Essigester extrahiert wurde. Nach Waschen mit  $H_2O$ ,  $NaHCO_3$ ,  $H_2O$  wurde die Lösung mit 2,2 g Phenylalaninäthylester in Äther vereinigt. Nach 24 Stdn. bei 5° wurde die Ätherlösung mit 0,5 n HCl,  $NaHCO_3$  und  $H_2O$  gewaschen, das Lösungsmittel im Vak. entfernt und der erhaltene Rückstand aus Alkohol-Wasser umkristallisiert. 2,4 g (53% d. Th.) kleine Nadeln vom Schmp. 158 bis 161° (*Kofler*).

c) 2,4 g des Esters wurden mit 1 n NaOH verseift und 1,7 g (75% d. Th.) Cbo-Tripeptid erhalten, das nach Umkristallisation aus Alkohol-Wasser keinen ausgeprägten Schmp. zeigt, sondern ab 130° (*Kofler*) langsam erweicht.

d)  $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanyl-DL-phenylalanin. 0,7 g des Cbo-Tripeptids wurden katalytisch hydriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vak. verblieb ein Öl, das unter Alkohol erstarrte. Durch Umkristallisation aus Wasser konnten 0,4 g (71% d. Th.) des in Stäbchen kristallisierenden Tripeptidhydrates vom Schmp. 172 bis 174° (*Kofler*) erhalten werden.

$C_{23}H_{27}O_6N_3 \cdot H_2O$  (459,49). Ber. C 60,12, H 6,36, N 9,15.  
Gef. C 60,15, 60,45, H 6,38, 6,45, N 9,15, 9,45.

#### 8. DL-Phenylalanyl- $\alpha$ -DL-glutamyl-DL-phenylalanin

1,497 g Cbo-DL-Phenylalanin (0,005 Mol) wurden in 10 ccm Dioxan gelöst und 1,25 ccm Tri-n-butylamin und 0,5 ccm Chlorameisensäureäthylester zugefügt. Diese Lösung wurde bei 5° mit 1,472 g  $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin in 10 ccm Wasser + 0,4 g NaOH vereinigt. Nach 1½ Stdn. bei 5° und 2 Stdn. bei 20° wurde das Dioxan entfernt und beim Ansäuern der wäßr. Lösung entstand ein weißer Niederschlag, der keinen ausgeprägten Schmp. zeigte. 1,47 g (51,2% d. Th.), löslich in Alkohol, Essigester, Chloroform; unlöslich in Wasser. Umkristallisationsversuche waren ohne Erfolg.

1,3 g des Cbo-Tripeptides wurden in der üblichen Weise hydriert. Es hinterließ ein Öl, das unter Aceton nach einiger Zeit erstarrte. 0,57 g (57,4% d. Th.). Das Tripeptid läßt sich aus Wasser-Aceton umfällen. Weißes amorphes Pulver ohne ausgeprägten Schmp.

$R_F$ -Wert (Schleicher und Schüll 2043 bm; Methyläthylketon : Pyridin : Wasser = 4 : 2 : 2) : 0,56<sub>4</sub>. Daneben tritt im Chromatogramm Glutamyl-phenylalanin auf,  $R_F$ -Wert 0,24<sub>3</sub>.

9.  $\alpha$ -DL-Glutamyl- $\alpha$ -DL-glutamyl-DL-phenylalanin

1,486 g Cbo-DL-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester (0,004 Mol) in 10 cem Dioxan mit 1 cem Tri-n-butylamin und 1,4 cem Chlorameisensäureäthylester wurden mit 1,18 g  $\alpha$ -DL-Glutamyl-DL-phenylalanin in 5 cem Wasser und 0,32 g NaOH vermischt. Nach 2 Stdn. bei 5° entsteht beim Ansäuern ein Öl. 1,05 g (39,5% d. Th.). Kristallisationsversuche waren erfolglos. Löslich in Alkohol, Essigester, unlöslich in Wasser, Ligroin.

0,95 g des Öls wurden mit Pd hydriert und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Es verblieben 0,33 g (54,5% d. Th.) eines Öls, das unter Aceton erstarrte und aus Wasser-Aceton umgefällt wurde. Umkristallisation erfolglos.

$R_F$ -Wert: 0,49; daneben tritt Glutaminsäure auf 0,39<sub>3</sub>. (Schleicher und Schüll 2043 bm; Methyläthylketon : Pyridin : Wasser = 4 : 1 : 2,5.)

$R_F$ -Werte der Di- und Tripeptide (Schleicher und Schüll 2043 bm, Methyläthylketon : Pyridin : Wasser = 4 : 2 : 2; Laufzeit 4 bis 5 Stdn., absteigend):

H-Glu-OH	0,13 <sub>4</sub> ,	H-Phe-OH	0,55 <sub>3</sub> ,
H-Glu-Glu-OH	0,05 <sub>4</sub> ,	H-Phe-Phe-Glu-OH	0,56 <sub>3</sub> ,
H-Phe-Glu-OH	0,26 <sub>7</sub> ,	H-Glu-Glu-Phe-OH	nicht trennbar von H-Glu-OH,
H-Glu-Phe-OH	0,22 <sub>7</sub> ,	H-Phe-Glu-Phe-OH	0,56 <sub>4</sub> ,
H-Phe-Phe-OH	0,69 <sub>4</sub> ,	H-Glu-Phe-Phe-OH	0,51 <sub>0</sub> .

Wurde Cbo-Glu-Phe-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> zur Herstellung von H-Glu-Phe-OH *nicht* mit Bicarbonat fraktioniert, so konnte bei H-Glu-Phe-OH ein Fleck mit zwei deutlichen Abgrenzungen erhalten werden. Bei H-Phe-Glu-Phe-OH tritt neben dem  $R_F$ -Wert 0,56<sub>4</sub> noch ein Fleck 0,24<sub>5</sub> von H-Glu-Phe-OH auf. Das Tripeptid aus 3 DL-Formen ist nur pseudokristallin und läßt sich nicht vom H-Glu-Phe-OH trennen. Analoges gilt für das H-Glu-Glu-Phe-OH, das noch H-Glu-OH enthält, mit Methyläthylketon : Pyridin : Wasser = 4 : 1 : 2,5 aber deutlich identifizierbar ist:  $R_F$ -Wert 0,49; Glu: 0,39<sub>3</sub>.

Die Arbeit wurde durch Spenden aus dem „Fonds Chemie“ unterstützt. Wir sprechen den zuständigen Stellen für die Gewährung der Beihilfe unseren verbindlichsten Dank aus.