

Carbobenzoxy-L-nitrotyrosyl-glycyl-DL-alanin-benzylester*¹

Von

Eugen Schnabel und Helmut Zahn

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg und dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1957)

Beim Azidieren von Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycin-hydrazid mit überschüssigem Nitrit wird der Phenolkern des eingebauten Tyrosins nitriert und bei der Reaktion des nitrierten Azids mit DL-Alanin-benzylester das Nitropeptidderivat erhalten.

1. Einleitung

Für die Untersuchung saurer und enzymatischer Partialhydrolysate von Seidenfibroin² sollte das Tripeptid Tyrosyl-glycyl-alanin nach dem Azidverfahren dargestellt werden. Dabei trat unerwarteterweise eine Nitrogruppe in den Phenolkern des eingebauten Tyrosins ein.

2. Synthese

Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycin-hydrazid wurde nach der Vorschrift von K. Ziegler³ gewonnen, wobei jedoch mit etwa der doppelten Menge Nitrit azidiert wurde. In früheren Arbeiten⁴ hatte sich Azidieren mit überschüssigem Nitrit auf Abscheidung und Ausbeute der Azide günstig ausgewirkt. Als wir jedoch zum Aufbau des gewünschten Tripeptidderivats das Zieglersche Hydrazid in saurer Lösung ebenfalls mit über-

* Fritz Wessely zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

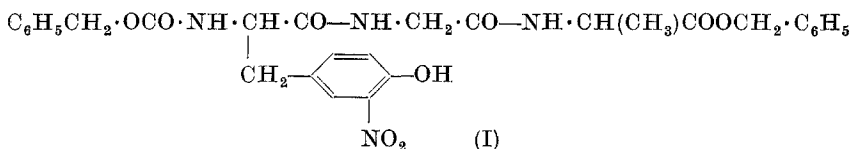
¹ 5. Mitteilung über Peptide. 4. Mitteilung vgl. H. Zahn und J. F. Diehl, Angew. Chem. **69**, 135 (1957).

² H. Zuber, unveröffentlichte Versuche, vgl. H. Zahn, Angew. Chem. **68**, 163 (1956).

³ K. Ziegler, Dissertation Univ. Heidelberg (1956).

⁴ H. Zahn und E. Schnabel, Ann. Chem. **604**, 62; **605**, 212 (1957).

schüssigem Nitrit versetzten, schied sich das Azid als gelbes Öl ab und bei der Vereinigung der gewaschenen und getrockneten Azidlösung mit DL-Alanin-benzylester⁵ bildete sich an Stelle des Tripeptidderivates dessen gelbgefärbte Mononitroverbindung I vom Schmp. 180 bis 181°



3. Eigenschaften

Die gelben Sphärolithe lösen sich in Alkalien unter intensiver Rotfärbung. Diazotierte Sulfanilsäure in sodaalkalischer Lösung kuppelt erst nach 12 Stdn. merklich. Diese Versuche sprechen für die Konstitution eines o-Nitroso- oder o-Nitrophenols.

Die Reduktion der Verbindung in methanolisch-salzsaurer Lösung mit SnCl_2 in der Siedehitze⁶ lieferte eine grauweiße Substanz, die in Methanol glatt löslich war und sich an der Luft rasch dunkel färbte, offensichtlich hatte sich eine aromatische Aminogruppe gebildet. Diazotierte Sulfanilsäure bildet mit einem alkalisch reduzierten Produkt sofort einen braunroten Azofarbstoff, dessen Farbe sich beim Ansäuern nach Rot aufhellt.

Zum direkten Nachweis der bei der Reduktion entstandenen aromatischen Aminogruppe wurde die saure Lösung der reduzierten Nitroverbindung auf 0° abgekühlt und mit überschüssiger Nitritlösung diazotiert, wobei eine schwache Gelbfärbung auftrat. Nach einiger Zeit wurde das Nitrit durch Digerieren mit einer sauren Harnstofflösung zerstört. Die gebildete Diazoniumverbindung ließ sich durch Kuppeln mit Dimethylanilin nachweisen. Der entstandene rote Azofarbstoff schlägt in alkalischer Lösung ins Grünliche bis Schwärzliche um.

Nachdem so bewiesen war, daß die eingetretene Gruppe N-haltig war, vermuteten wir zunächst eine direkte Kernnitrosierung durch das überschüssige Nitrit. Aber die Analyse zeigte einen zu tiefen C- und N-Wert. Nur bei Annahme von 1 Mol Konstitutionswasser würde die Analyse auf ein Nitrosoderivat stimmen. *Kratzsch*⁷ sowie *Ziegler*³ hatten bei Tyrosinpeptiden wiederholt Hydratwasser festgestellt. Aber die *Liebermannsche* Reaktion verlief negativ und auch der Umsatz mit Anilin zur Gewinnung einer Azoverbindung war erfolglos. Es mußte sich also um eine Nitrogruppe handeln, zumal die Analyse gut überein-

⁵ H. K. Miller und H. Waelsch, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1092 (1952).

⁶ Zuvor wurde am Carbobenzoxy-glycin festgestellt, daß die Carbobenzoxy-gruppe beim Reduzieren mit Zn-Staub in salzsaurer Lösung kaum angegriffen wird.

⁷ E. Kratzsch, Dissertation Univ. Heidelberg (1955).

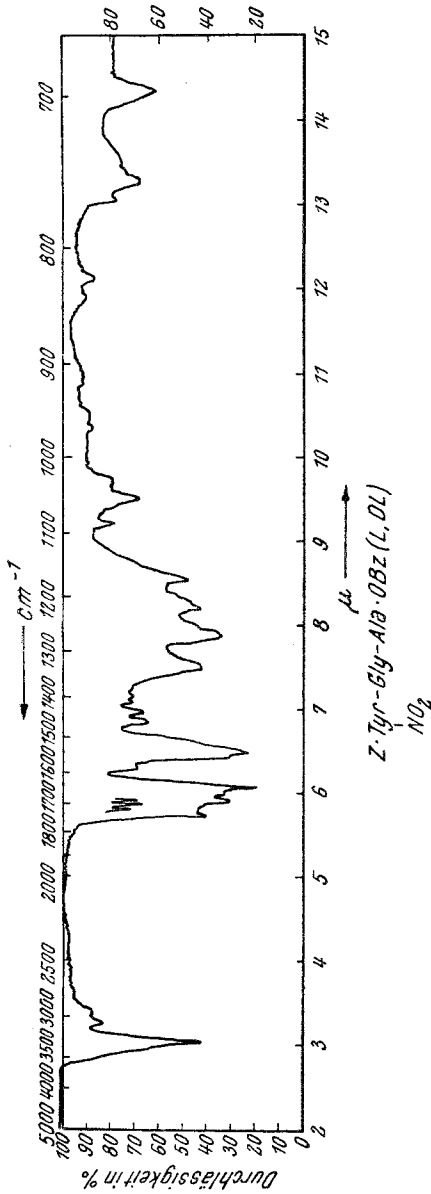


Abb. 1

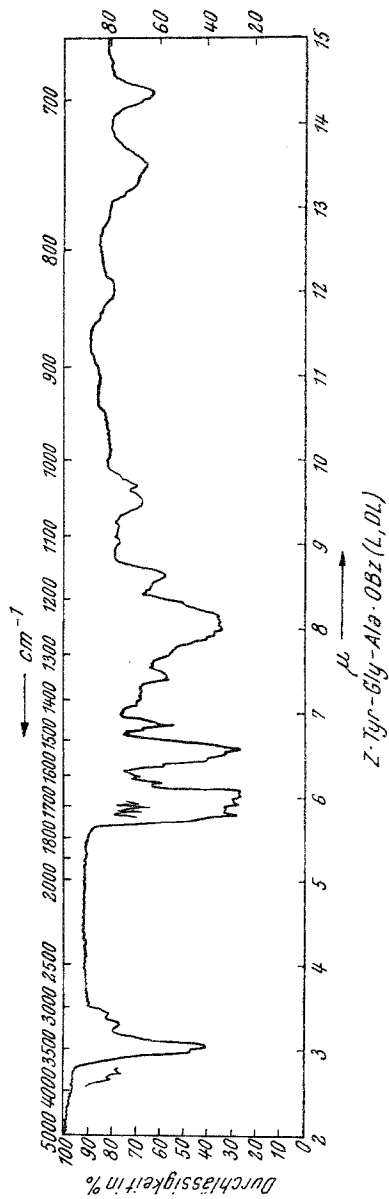


Abb. 2

stimmt. Das IR-Spektrum ermöglichte keine eindeutige Entscheidung. Bellamy⁸ ordnet der Nitrogruppe Banden bei 1300 bis 1350 K und 1500

⁸ L. J. Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution. Darmstadt: Dr. Steinkopff-Verlag, 1955.

bis 1600 K zu. Nach einer Arbeit von *Franck, Hörmann und Scheibe*⁹ ist das Absorptionsmaximum bei 1540 K — je nach den übrigen Substituenten variieren die Werte von 1490 bis 1550 K — besonders charakteristisch, während die Bande bei 1350 K stärker gestört ist. Vergleicht man die IR-Spektren unserer Verbindung I (Abb. 1) und der nicht substituierten Verbindung (Abb. 2), so erkennt man große Unterschiede. Eine schwache Bande bei 1110 K fehlt im Spektrum des Nitropeptids. Sie ist charakteristisch für p-Substitution. Dafür treten eine Reihe von teilweise schwachen Absorptionsstellen neu auf. So die für 1,2,4-Trisubstitution charakteristischen Banden bei 755 K, 841 K und 1209 K. Einige Peaks lassen sich nicht zuordnen, wie z. B. die bei 1270 K und 1395 K, während die bei 1350 K und 1540 K erwarteten NO₂-Banden von Phenol- und Amidbanden überlagert werden und beim Nitroderivat nur etwas stärker sind — eine „Verschiebung“ der Amidbande II um 18 cm⁻¹ könnte ebenfalls durch die Anwesenheit der Nitrogruppe erklärt werden.

4. Diskussion

Schon von *Rohrlich*¹⁰ und anderen wurden Modellversuche zur Aufklärung der Farbreaktion von Proteinen mit Nitrit bzw. salpetriger Säure durchgeführt. *Rohrlich* konnte die Bildung einer kupplungsfähigen Diazoniumverbindung nachweisen. Andererseits haben *Philpot* und *Small*¹¹ die primäre Bildung einer Nitrosoverbindung experimentell bestätigt. *Rohrlich* vermutet die Oxydation dieses Nitrosokörpers zur Nitroverbindung und dem Diazoniumnitrat durch die naszierenden Stickoxyde. Die Bildung eines Diazoniumsalzes konnten wir nicht beobachten und auch beim Umsatz von Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycyl-DL-alanin-benzylester mit salpetriger Säure entstand keine mit Dimethylanilin kuppelnde Zwischenverbindung. Wir führen daher die Entstehung des Carbobenzoxy-L-nitrotyrosyl-glycyl-DL-alanin-benzylesters teilweise auf die direkte Nitrierung des aromatischen Phenolkerns durch die beim Lösen der nitrosen Gase aus dem überschüssigen Nitrit gebildete Salpetersäure zurück, zumal die elektrophile Nitrierungsreaktion beim eingebauten Tyrosin schon mit sehr verdünnter Salpetersäure¹² sehr rasch erfolgt. Wahrscheinlich laufen beide Reaktionen nebeneinander ab.

Experimenteller Teil

1. Carbobenzoxy-L-nitrotyrosyl-glycyl-DL-alanin-benzylester

15 g Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycin-hydrazid wurden in einer Mischung von 14 ccm konz. HCl, 30 ccm Eisessig und 350 ccm H₂O unter heftigem

⁹ B. Franck, H. Hörmann und S. Scheibe, Chem. Ber. **90**, 330 (1957).

¹⁰ M. Rohrlich, Chem.-Ztg. **80**, 847 (1956).

¹¹ J. St. L. Philpot und P. Small, Biochemic. J. **32**, 534, 542 (1938).

¹² H. Zahn und K. Kohler, Z. Naturforsch. **5 b**, 137 (1950).

Vibriären gelöst und vom ungelösten gelatinösen Rückstand abgesaugt. Bei -3° wurde eine Lösung von 7,5 g Natriumnitrit langsam zugegeben und das sirupös ausgefallene Azid in 500 ccm kaltem Essigester aufgenommen. Der Essigesterextrakt wurde mit kalter Bicarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Dann wurde mit einer Aufschlammung von 18 g DL-Alanin-benzylester-benzolsulfonat in 50 ccm Chloroform und 10 ccm Triäthylamin versetzt und 24 Stdn. bei Zimmertemp. gehalten. Nach dem sauren, bicarbonatalkalischen und wäßrigen Waschen wurde das Lösungsmittelgemisch bei 40° im Vak. abdestilliert. Es hinterblieb ein hellbrauner Sirup, der mehrfach in Methanol gelöst wurde, wobei der Alkohol jeweils im Vak. abgezogen wurde. Schließlich wurde wieder in Methanol aufgenommen; beim Aufbewahren im Eisschrank schieden sich allmählich 4,3 g (= 19% d. Th.) gelbe Kristalle aus. Zur Analyse wurde mehrfach aus viel Methanol umkristallisiert und gelbe Körner vom Schmp. 180 bis 181° erhalten. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,3^{\circ}$.

Nitrosoverbindung $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$ (562,56). Ber. C 61,91, H 5,37, N 9,96.

Hydrat der Nitrosoverbindung $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (580,58). Ber. C 59,99, H 5,55, N 9,65.

Nitroderivat $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_9$ (578,56). Ber. C 60,20, H 5,23, N 9,71.
Gef. C 60,13, H 5,28, N 9,67.

2. Reduktion von I

a) *Sauer*: Eine Spatelspitze I wurde mit wenig konz. Salzsäure versetzt, in wäßr. Methanol gelöst und mit viel SnCl_2 kurz aufgeköcht.

Die Reaktionslösung färbte sich zunächst braun, hellte sich dann aber wieder auf. Eine schwache Gelbfärbung wurde durch Filtrieren über ein mit Zn-Staub beschicktes Filter beseitigt und gleichzeitig die Sn-Ionen als Metall auf dem Zn niedergeschlagen. Die Reduktion wurde nach diesem Reduktorprinzip auch mit Zn-Staub allein durchgeführt. Nach dem Alkalischemachen schied sich in der Kälte ein weißlichgrauer Niederschlag ab, der sich an der Luft rasch dunkel färbte und in Methanol glatt löslich war, was auf eine Aminogruppe hinweist.

b) *Alkalisch*: Da sich das Nitroderivat glatt in Laugen löst, führten wir nach dem Reduktorprinzip auch eine alkalische Reduktion mit *Devarda*-scher Legierung durch. Das farblose Filtrat bildete mit einer Lösung von diazotierter Sulfanilsäure sofort einen braunroten Azofarbstoff, dessen Farbe sich beim Ansäuern nach Rot aufhellte. Der gleiche Farbstoff wurde auch aus den sauer reduzierten Ansätzen bei der alkalischen Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure erhalten.

3. Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycyl-DL-alanin-benzylester

12,5 g Carbobenzoxy-L-tyrosyl-glycin-hydrazid wurden in der gleichen Weise wie bei 1, aber mit der stöchiometrischen Menge Natriumnitrit azidiert und das in Essigester aufgenommene Azid mit DL-Alanin-benzylester — aus 15 g Benzolsulfonat — umgesetzt. Nach dem üblichen Aufarbeiten wurde ein hellgelber Sirup erhalten, der, in Essigsäure gelöst, schließlich zu kristallisieren begann und unter Äther durchkristallisierte. Die weißen Nadeln waren

in Methanol sehr gut löslich und wurden mehrfach aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute 6,5 g = 35% d. Th. Schmp. 175 bis 176°.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19,5^{\circ}$ ($c = 1$; Methanol).

$\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ (533,56). Ber. C 65,28, H 5,86, N 7,88.

Gef. C 65,50, H 5,86, N 8,08.

Herrn Dr. *H. v. Dietrich* danken wir für die Aufnahme der IR-Spektren, der BASF für die Überlassung von Chemikalien und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.