

Konstitutionsermittlung von Peptiden VIII¹

Über den Abbau von Methionin-, Cystin-, Serin-, Prolin-,
Tryptophan- und Histidin-Peptiden¹

XIII. Mitteilung über Peptide¹

Von

K. Schlögl, F. Wessely und H. Woidich

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 7. April 1956)

Die früher angegebene Möglichkeit zur Konstitutionsermittlung von Peptiden über N-Carbobenzoxyderivate wurde auf Peptide mit den im Titel genannten Aminosäuren am Aminoende ausgedehnt. Dabei auftretende Schwierigkeiten konnten so weit überwunden werden, daß sich der Abbau auch dieser Peptide (in allen Fällen im Mikromaßstab, in der Mehrzahl der Fälle auch präparativ) erreichen läßt.

Im Laufe der Arbeit wurden bisher noch nicht beschriebene N-Cbzo-Dipeptidester (I), Hydantoin-3-essigsäuren (III) und 3-Aminohydantoine (X) sowie einige sich davon ableitende Produkte dargestellt (Tabelle 2 und 3).

Quantitative Untersuchung der Laugeumlagerung von Cbzo-Dipeptiden zeigte, daß diese Umlagerung mit großer Wahrscheinlichkeit den schon früher postulierten Verlauf (über Hydantoin-peptide als Zwischenstufen) nimmt. Ein möglicher Mechanismus für die Bildung dieser Zwischenstufen (und der 3-Aminohydantoine) wird diskutiert.

In früheren Mitteilungen² wurde eine Methode zur Bestimmung der N-endständigen Aminosäure(N-AS) und der ihr benachbarten in Peptiden beschrieben, die über substituierte Hydantoin-3-essigsäuren (III) verläuft; die Grenzen des Verfahrens wurden diskutiert und Schwierigkeiten,

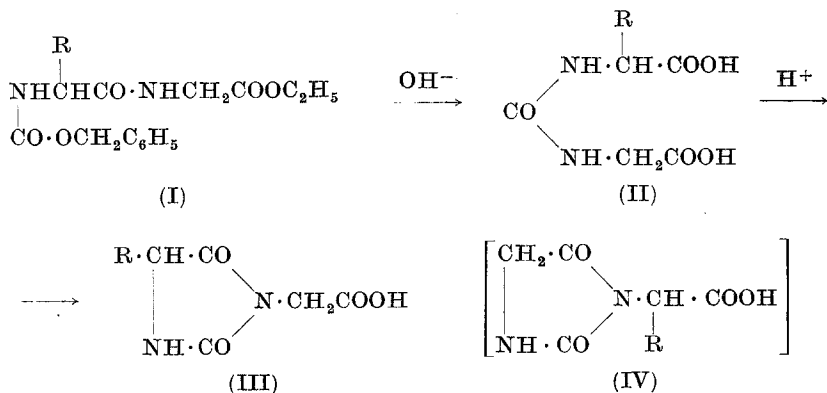
¹ VII. Mitteilung über Konstitutionsermittlung und XII. Mitteilung über Peptide: K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich, Mh. Chem. 85, 957 (1954).

² Siehe VII. und frühere Mitteilungen.

die etwa bei Lysyl³- oder Glutamyl⁴-peptiden auftraten, behandelt. Später konnte die Methode dann auch auf die gleichzeitige Bestimmung der N- und C-endständigen Aminosäuren (N- und C-AS) ausgedehnt werden¹.

Es schien wünschenswert, diese Verfahren auch in Fällen zu untersuchen, bei denen Aminosäuren am Aminoende vorlagen, die Schwierigkeiten erwarten ließen. In dieser Mitteilung soll also über Versuche berichtet werden, den Abbau auch für Peptide zu ermöglichen, die die im Titel genannten Aminosäuren als N-AS tragen. Damit haben wir nun zusammen mit den früher abgebauten Peptiden² praktisch alle wichtigen in Frage kommenden Möglichkeiten erfaßt. Wohl wurden die Versuche nur an Dipeptiden mit den fraglichen Aminosäuren als N-AS und Glycin als C-AS ausgeführt, Peptide, bei denen sich ein Abbau im eigentlichen Sinne, also die Bestimmung der beiden Aminosäuren am Aminoende oder die gleichzeitige Ermittlung der N- und C-AS erübrigen würde. Es genügen jedoch die an diesen Dipeptiden erhobenen Befunde, um zu zeigen, daß die Bildung von Hydantoin-3-essigsäuren (III) auch in den vorliegenden Fällen möglich ist; damit ist dem Prinzip des Abbaues Genüge getan, da dafür nur die beiden endständigen Aminosäuren von Bedeutung sind, während die restliche Peptidkette praktisch ohne Einfluß ist.

In den Fällen der Met-, Try- und His-Glycin-Peptide konnte auch der Hydrazinabbau¹ mit Erfolg ausgeführt werden. Wie schon früher gezeigt, läßt sich beim Serin und Cystin die Bildung der dafür nötigen 3-Aminohydantoine (X) nicht erreichen^{1, 5}.



In allen Fällen erfolgte die Umwandlung der N-Cbzo-Dipeptidester (I), die, wenn noch nicht beschrieben, auf bekannten Wegen erhalten wurden

³ K. Schlögl und H. Fabitschowitz, Mh. Chem. 84, 937 (1953).

⁴ F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 84, 263 (1953).

⁵ K. Schlögl, J. Derkosch und E. Wawersich, Mh. Chem. 85, 607 (1954).

(Tabelle 2), in die Carbonyl-bisamino-säuren (II) wie üblich durch Erwärmen mit wäßr.-alkohol. Lauge; diese wurden, wenn möglich, durch Extraktion isoliert und rein dargestellt (Met-CO-Gly, Try-CO-Gly und Pro-CO-Gly), sonst wurden sie direkt mit HCl zu den Hydantoin-3-essigsäuren (III) ringgeschlossen.

Bei der Laugeumlagerung waren bis auf das Serinderivat, das dabei wegen seiner Alkalilabilität⁶ zum Teil zerstört wurde, keine Schwierigkeiten zu erwarten. Bei den Cystinpeptiden, die bei Laugebehandlung unübersichtliche Zersetzungen erleiden, konnte diese Schwierigkeit durch S-Benzilylierung umgangen werden, wobei man III ($R = C_6H_5CH_2SCH_2$) als definierte kristalline Verbindung erhielt, die nach Hydrolyse neben Gly und S-Benzyl-Cystein im Chromatogramm auch noch etwas Cystin und Cystein zeigte. Im Mikroabbau führte auch Oxydation des N-Cbz-Cystinpeptides mit Perameisensäure zum Ziel, die im präparativen Maßstab allerdings nur nicht kristalline hygroskopische Zwischenprodukte ergab; nach Hydrolyse der letzten Stufe (III) lagen am Papier dann aber die erwarteten Aminosäuren Glycin und Cysteinsäure vor.

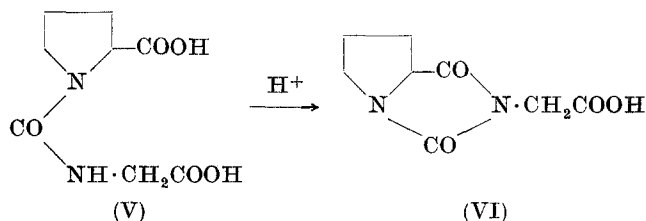
Der Säureringschluß zu den Hydantoin-3-essigsäuren (III) verlief durchwegs glatt, nur durfte beim Try-CO-Gly wegen der bekannten Säurelabilität des Tryptophans nur kurz mit HCl erwärmt werden (5 Min.), was aber durchaus zum Ringschluß ausreichte. Allerdings wird bei höheren Peptiden mit Try als N-AS, bei denen zur Abspaltung der restlichen Peptidkette länger hydrolysiert werden muß, partielle Zersetzung des Try kaum zu vermeiden sein. Zum Nachweis der beiden aminoendständigen Aminosäuren ist hier die Hydrolyse von (III) mit $Ba(OH)_2$, statt wie üblich mit HCl auszuführen.

Die Peptide des Met, Try und S-Benzyl-Cysteins (mit Gly als C-AS) ergaben kristallisierte Hydantoin-3-essigsäuren, beim Serin konnte nur in geringen Ausbeuten ein Produkt fraglicher Reinheit gefaßt werden und das Pro-Derivat (VI) war im Gegensatz zu der wenn auch nur langsam kristallisierenden Carbonyl-bisamino-säure (V, Pro-CO-Gly) nicht kristallin zu erhalten. Das Histidin-Derivat endlich ist ja wegen des wenn auch nur schwach basischen Charakters des Imidazol-N aus der sauren Lösung nicht extrahierbar, es konnte aber als Methylester isoliert und kristallisiert gewonnen werden. Für den Fall des Abbaues aber erübrigt sich hier das Isolieren in Substanz; die entsprechende Hydantoin-3-essigsäure kann am Papierschromatogramm mit diazotierter Sulfanilsäure (wie alle Histidinderivate) nachgewiesen, aus einem Parallelchromatogramm eluiert⁷ und hydrolysiert werden. Im Hydrolysat liegen dann His und Gly vor.

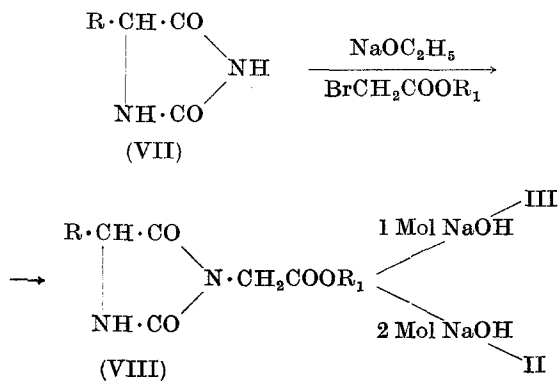
⁶ F. Bettzieche und R. Menger, Z. physiol. Chem. **150**, 177 (1925); **172**, 56 (1927).

⁷ K. Schlögl, A. Siegel und F. Wessely, Z. physiol. Chem. **291**, 265 (1952).

Für Vergleichszwecke und vor allem, um die Konstitution der Hydantoin-3-essigsäuren festzulegen — es kämen ja bis auf das Pro-Derivat (VI) auch die isomeren Formen (IV) in Frage, wenn diese auch



in unseren Fällen aus früher diskutierten Gründen⁸ kaum zu erwarten waren —, wurden die Verbindungen 1, 4 und 5 der Tabelle 3 synthetisiert und mit den durch Abbau erhaltenen verglichen. Die Darstellung erfolgte durch Umsetzung der Hydantoine (VII) (als Na-Salze) mit Bromessigester und Verseifung der gebildeten Hydantoin-3-essigester (VIII). Die krist. Derivate des Met und Try erwiesen sich in der Mischprobe mit den durch Abbau erhaltenen Produkten (verglichen wurden die Äthylester 1a und 5a der Tabelle 3) als identisch. Das synthetische Pro-Derivat war aber ebenso wie das beim Abbau erhaltene nicht kristallisiert zu gewinnen, doch erwiesen die IR-Spektren der beiden Methylester die Identität⁹. Aufspaltung des synthetischen Produktes mit Alkali lieferte dieselbe kristallisierte Carbonyl-bisaminosäure (V), die schon die Laugebehandlung von Cbz-Pro-Gly ergeben hatte. Auch aus den synthetischen Verbindungen (VIII) des Met und Try konnten durch Laugeaufspaltung die mit den auf Abbaueweg erhaltenen identischen Carbonyl-bisaminosäuren (II) gewonnen werden.



⁸ F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem, 83, 1426 (1952); siehe auch 83, 1156 (1952).

⁹ Für die Aufnahme der Spektren danken wir Herrn Dr. J. Derkosch bestens.

Im Falle des Pro-Produktes war eine Isomeriemöglichkeit (im Sinne III und IV) überhaupt ausgeschlossen, da ja ein Pro-CO-Gly (V) nur eine Möglichkeit des Ringschlusses, nämlich zu (VI) hat. Deshalb muß der Abbau auch versagen, wenn in einem Peptid Pro der N-AS benachbart ist, da auch hier das N-Cbzo-Peptid keine Möglichkeit eines intermediären Ringschlusses zu einem Hydantoin-peptid besitzt. Tatsächlich trat bei der Laugebehandlung von Cbzo-Gly-Pro-ester nur Verseifung zum Cbzo-Gly-Pro ein.

Beim Versuch der Synthese von VIII ($R = C_6H_5CH_2SCH_2$) aus dem Hydantoin des S-Benzyl-Cysteins (VII, $R = C_6H_5CH_2SCH_2$), Na-äthoxyd und Bromessigsäure-äthylester ergab sich die überraschende Tatsache, daß aus der Reaktionsmischung S-Benzylthioglykolsäure-äthylester ($C_6H_5CH_2SCH_2COOC_2H_5$) isoliert werden konnte, der dann noch durch Verseifung zur freien Säure bzw. durch Umsetzung zum Amid eindeutig identifiziert wurde. Es mußte also durch das Na-äthoxyd intermediäre Spaltung der Thioätherbindung unter Bildung von Benzylmerkaptan-(Na) eingetreten sein, das sich dann mit Bromessigester zu der isolierten Verbindung umsetzte. Es ist dies ein anormaler Fall der (Ab-)spaltung eines S-Benzylrestes, denn üblicherweise bleibt der Schwefel ja mit dem Restmolekül und nicht mit dem Benzyl verknüpft¹⁰. Trotz mehrfacher Variation der Versuchsbedingungen konnte das gewünschte Reaktionsprodukt (III, $R = C_6H_5CH_2SCH_2$) nicht erhalten werden; *Crombie* und *Hooper* stießen bei der Behandlung von Cystin-bis-3-phenylhydantoinen mit Na in flüssigem Ammoniak ebenfalls auf Schwierigkeiten¹¹. Es besteht aber unseres Erachtens bei der durch Abbau erhaltenen krist. Hydantoin-3-essigsäure des S-Benzyl-Cysteins vor allem in Analogie zu den übrigen Fällen kaum ein Zweifel an der angenommenen Struktur (gemäß Formel III).

Auch beim Serin und Histidin konnten die Hydantoin-3-essigsäuren auf dem synthetischen Weg nicht erhalten werden. Das Hydantoin des Serins lieferte nur unidentifizierbare Produkte, was vielleicht auf die erwähnte Labilität des Serinrestes zurückzuführen sein dürfte. Das Hydantoin des Histidins war in der Literatur nur einmal erwähnt¹², konnte aber auf diesem Weg (Umsetzung von His mit Harnstoff) nicht erhalten werden und auch die Reaktion mit KCNO lieferte nur ein stark verunreinigtes Produkt; als dieses Rohprodukt in üblicher Weise mit Bromessigester zur Reaktion gebracht wurde, lag in der Reaktionsmischung wohl der gewünschte Hydantoin-3-essigester in geringer Menge vor, wie aus papierchromatographischem Vergleich mit dem durch Abbau erhaltenen reinen Produkt hervorging, konnte jedoch daraus nicht isoliert werden.

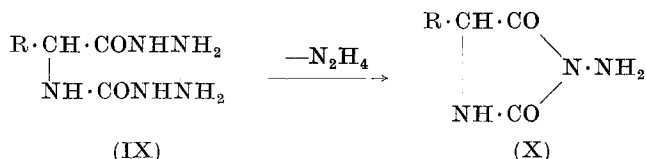
Der eingangs erwähnte Hydrazinabbau¹, also die gleichzeitige Bestimmung der N- und C-AS wurde an den 4 Peptiden Met-Gly, Pro-Gly, Try-Gly und His-Gly (als N-Cbzo-Peptide) im Mikromaßstab in der früher beschriebenen Weise¹ ausgeführt und lieferte eindeutige Ergebnisse. Die gebildeten 3-Aminohydantoine (X) wurden in allen Fällen nur durch

¹⁰ *D. St. Tarbell* und *D. P. Harnish*, Chem. Rev. 49, 1 (1951).

¹¹ *L. Crombie* und *K. C. Hooper*, J. Chem. Soc. London 1955, 3010.

¹² *M. N. Shchukina*, J. Gen. Chem. USSR 10, 1108 (1940); Chem. Abstr. 35, 4022 (1941).

Papierchromatographie vom Gly abgetrennt, im Falle des Met- und Try-Derivates wurden sie als solche durch (papierchromatographischen) Vergleich mit synthetischen Proben⁵ identifiziert, beim Pro und His wurde noch zusätzlich aus einem Parallelchromatogramm eluiert und nach Hydrolyse Pro bzw. His nachgewiesen. Die noch nicht beschriebenen 3-Aminohydantoine (X) des His und Pro wurden auch präparativ durch energische Hydrazinbehandlung ihrer Cbzo-ester und Ringschluß der dabei gebildeten N-Carbonsäure-dihydrazide (IX) dargestellt⁵. Auch hier waren beim Pro wieder sowohl das Dihydrazid wie das Aminohydantoin nur nicht kristallisierende Öle.



Da viele der erwähnten Substanzen durch Papierchromatographie nachgewiesen bzw. im Zuge des Peptidabbaues überhaupt nur am Papier identifiziert wurden, sind in der folgenden Tabelle 1 die R_F -Werte einer größeren Anzahl von Derivaten angeführt.

Tabelle 1. R_F -Werte

Verbindung	Formel Nr.	R =	R_F
N-Cbzo-Met	—	—	0,74
Di-Cbzo-Cystin	—	—	0,60
N-Cbzo-S-Benzyl-Cystein	—	—	0,67
N-Cbzo-Ser	—	—	0,63
N-Cbzo-Pro	—	—	0,68
N-Cbzo-Try	—	—	0,71
Cbzo-Met-Gly	—	—	0,59
Cbzo-Try-Gly	—	—	0,61
Met-CO-Gly	II	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$	0,23
Pro-CO-Gly	V	—	0,17
Try-CO-Gly	II	$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$	0,22
His-CO-Gly	II	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2$	0,06
Derivat des Gly	III	H	0,22
„ „ Phe	III	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	0,53
„ „ Met	III	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$	0,44
„ „ S-Benzyl-Cys	III	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SCH}_2$	0,54
„ „ Ser	III	HOCH_2	0,20
„ „ Pro	VI	—	0,39
„ „ Try	III	$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$	0,45
„ „ His	III	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2$	0,23
Derivat des Pro	X	—	0,52
„ „ His	X	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2$	0,28

Es wurde absteigend auf Schleicher-Schüll 2043 a mit dem Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Äthanol-Ammoniak-Wasser (4 : 4 : 1 : 1)⁷ chromatographiert. Der Nachweis der Säuren erfolgte durch Fluoreszenzlöschung von 4-Methylumbelliferon⁷, der der His-Derivate mit diazotierter Sulfanilsäure und die 3-Aminohydantoine wurden mit Lauge und ammoniakal. AgNO_3 — wie früher beschrieben¹ — nachgewiesen. Als Vergleichs- und Bezugssubstanzen sind in der Tabelle auch die R_F -Werte der Hydantoin-3-essigsäure (III, R = H) und der 5-Benzyl-hydantoin-3-essigsäure (III, R = Benzyl) angegeben.

Im Zusammenhang mit der Laugebehandlung empfindlicher Cbzo-Peptide (etwa von Serinderivaten) und auch um näheren Einblick in den Mechanismus der Umlagerung von I nach II zu gewinnen, wurden quantitative Studien an einigen Cbzo-Dipeptiden durchgeführt, wobei der Laugeverbrauch (0,1 n NaOH bei 75°) durch potentiometrische Titration verfolgt wurde. In einem Falle (Cbzo-Gly-Gly) wurde die Umlagerung auch mit 0,5 n NaOH ausgeführt, da mit dieser Konzen-

tration ja beim tatsächlichen Abbau gearbeitet wird; wie aus der Abb. 1 hervorgeht, erfolgt jedoch dabei die Umsetzung schon so rasch, daß sie nur mehr schwierig zu verfolgen ist.

Wenn als Intermediärprodukt zwischen dem Cbzo-Dipeptid (I) und dem tatsächlich isolierten Produkt (II) ein Hydantoinpeptid (vom Typ III) gefordert wird, dann erfolgt der Verbrauch eines 2. Äquivalentes Alkali erst bei der Ringöffnung dieses Hydantoins, während beim ersten Schritt, der formal in der Abspaltung von Benzylalkohol besteht, noch keine Lauge verbraucht wird. Außer bereits früher⁸ diskutierten Gründen für die Annahme des erwähnten Hydantoinpeptides als Zwischenprodukt konnten wir diese auch noch dadurch stützen, daß Hydantoin-3-essigsäure selbst deutlich rascher Lauge verbrauchte, als Cbzo-Gly-Gly; dies muß ja der Fall sein, wenn die Reaktion von Cbzo-Gly-Gly zu Gly-CO-Gly über Hydantoin-3-essigsäure als Zwischenprodukt verläuft.

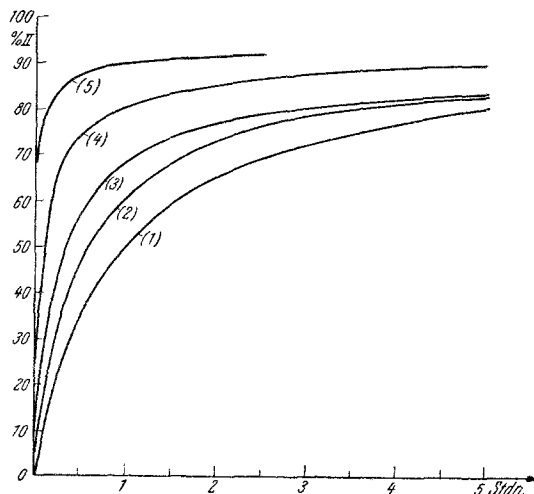
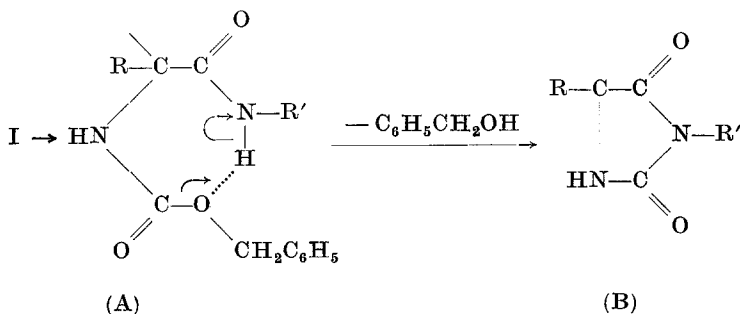


Abb. 1. Umlagerung der Cbzo-Dipeptide in Carbonyl-bisamino-säuren (II) bei 75°

- | | |
|--|------------------|
| (1): Cbzo-Try-Gly | } mit 0,1 n NaOH |
| (2): Cbzo-Met-Gly | |
| (3): Cbzo-Gly-Gly | |
| (4): Hydantoin-3-essigsäure (III, R=H) | } mit 0,1 n NaOH |
| (5): Cbzo-Gly-Gly | |

Wie die in der Abb. 1 enthaltenen Zeit-Umsatz-Kurven zeigen, ist nach verhältnismäßig kurzer Zeit schon ein großer Teil umgesetzt (die Umsätze wurden aus dem Laugeverbrauch berechnet), während sich die Kurve dann nur langsam gegen höhere Werte zu bewegt. Sehr wahrscheinlich treten dann schon weitere sekundäre Veränderungen der gebildeten Carbony-bis-aminosäuren auf. Nach 3 Stdn., also einer Zeit, die beim tatsächlichen Abbau nicht überschritten wird, waren laut Papierchromatogramm in keinem der untersuchten Fälle freie Aminosäuren abgespalten worden. Daß das Cbz-Gly-Gly rascher als die beiden anderen untersuchten Peptide reagiert, deren N-AS den größeren Rest besitzen (hier wieder Met-Gly rascher als Try-Gly), steht nur in scheinbarem Widerspruch zur Tatsache, daß bei solchen Aminosäuren mit großen Resten R Ringschluß zu den Hydantoin-3-essigsäuren (mit H^+) rascher und glatter erfolgt⁸; wir erfassen durch den Laugeverbrauch ja nur die Ringöffnung der primär gebildeten Hydantoin-3-essigsäuren, und diese werden um so stabiler sein, je größer der Rest R am C-Atom 5 ist¹³. Die Stabilität wird also vom Gly zum Try zunehmen, und in dieser Richtung nimmt ja auch der Laugeverbrauch zu einer gegebenen Zeit ab. Somit scheint man auch zur Annahme berechtigt, daß die Hydantoin-3-essigsäuren tatsächlich in Substanz als Zwischenprodukte auftreten und damit die beiden Schritte Ringschluß und Ringöffnung getrennt sind und nicht zu einem Vorgang etwa in einem „Transition-state“ verschmelzen.

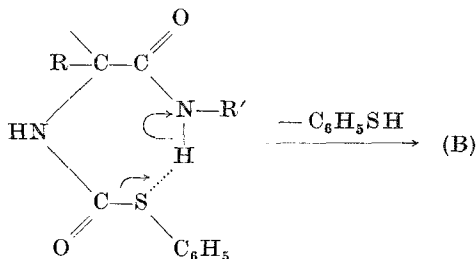
Der erste Schritt, also die Abspaltung von Benzylalkohol aus dem Cbz-Peptid (I) und die Bildung des Hydantoins kann als „Four-center-type Elimination Reaction“ formuliert werden. Elektronenverschiebung im Transition-state (A), die wahrscheinlich durch den normalen Verseifungsmechanismus mit Angriff von OH^- auf das Carbonyl-C-Atom im alkalischen Milieu begünstigt wird, führt dann zur Eliminierung von Benzylalkohol und gleichzeitiger Ausbildung der Bindung zwischen Carbonyl-C und Peptid-N und liefert somit das Hydantoin B.



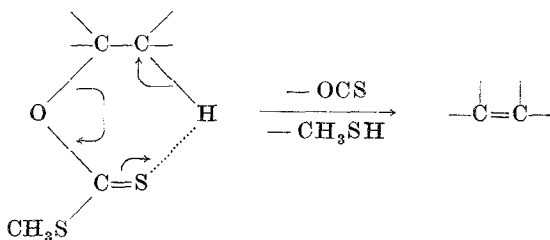
¹³ Siehe auch z. B.: E. Ware, Chem. Rev. 46, 403 (1950).

¹⁴ F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. 83, 1439 (1952).

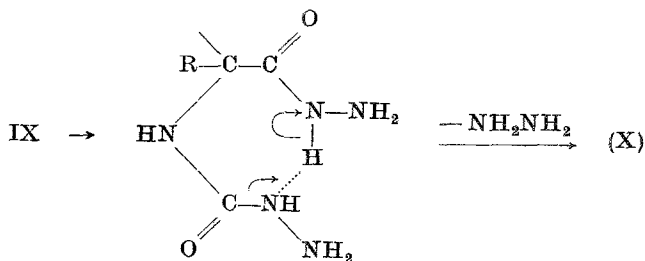
Bei der Bildung von Hydantoin-5-essigsäuren aus Phenyl-thiocarbonyl-peptiden¹⁴ wird die Abspaltung von Thiophenol aus dem Transition-state durch Abfangen mit Bleiacetat als Blei-thiophenolat noch wesentlich erleichtert werden.



Auch durch bloßes Erhitzen kann — wie gezeigt¹⁴ — in günstigen Fällen der Ringschluß von Phenylthiocarbonyl-peptiden erreicht werden. Diese Reaktion zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit der thermischen Behandlung von Xanthogenaten (*Tschugaeff*-Reaktion). Diese führt unter Abspaltung von Methylmerkaptan (und OCS) allerdings zu ungesättigten Verbindungen, da hier keinerlei Möglichkeit zu einem Ringschluß gegeben ist.^{14a}



Schließlich kann auch noch die Bildung der 3-Aminohydantoine (X) aus den α -Amino-N-carbonsäure-dihydraziden (IX)^{1,5} auf analoge Weise zwanglos erklärt werden. Abspaltung des Hydrazins aus dem Transition-state wird hier durch Erhitzen der wäßrigen Lösung (Wasserdampflichkeit von N_2H_4) begünstigt.



^{14a} G. L. O'Connor und H. R. Nace, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5454 (1952) 75, 2118 (1953).

Tabelle 2
N-Cbzo-Peptidester (I) und N-Cbzo-Peptide

Peptid	Ester	Schmp. ¹⁵ °C	Umkrist. aus	Formel	Ber.	Gef.	Dargest. nach Methode ¹⁶	Aus- beute %
Di-Cbzo-L-Cys(SS)-di-Gly	Äthyl	169—171	Essigester	$C_{30}H_{38}O_{10}N_4S_2$	C 53,08 H 5,64	52,97 5,79	A	57
Cbzo-S-Benzyl-L-Cys(SH)- Gly	Äthyl	99—100	Essigester	$C_{22}H_{26}O_5N_2S$	C 61,37 H 6,09	61,00 6,36	C ¹⁷	71
Cbzo-DL-Ser-Gly	Äthyl	88—90	Essigester- Petroläther	$C_{15}H_{20}O_6N_2$	C 55,56 H 6,21	56,18 6,17	B	78
Cbzo-L-Pro-Gly	Äthyl	Öl	—	$C_{17}H_{22}O_5N_2$	OC_2H_5	13,37	A	88
Cbzo-DL-Try-Gly	Äthyl	123—125	Essigester- Petroläther	$C_{23}H_{25}O_5N_3$	N 9,92	10,11	A	69
Cbzo-DL-Try-Gly	—	183—185	Essigester- Petroläther	$C_{21}H_{21}O_5N_3$	ÄG 395	399	A	70
Cbzo-L-His-Gly	Äthyl	Öl	—	$C_{18}H_{22}O_5N_4$	OC_2H_5	12,04	B ¹⁸	79

¹⁵ Alle in dieser Arbeit angegebenen Schmelzpunkte wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt.

¹⁶ Methode A: Über das gemischte Anhydrid mit Kohlensäure-äthylester. B: Azidmethode. C: Mit Dicyclohexylcarbodiimid nach J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

¹⁷ St. Goldschmidt und Ch. Jutz, Chem. Ber. **86**, 1116 (1953), geben als Schmp. 98 bis 99° an.

¹⁸ Analog der Darstellung von R. W. Holley und E. Sondheimer, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1326 (1954) für den Cbzo-His-Ala-äthylester.

Tabelle 3
Carbonyl-bisaminosäuren (II)

Nr.	Aus AS	Löser	R =	Schmp. °C	Umkrst. aus	Formel	Ber.	Gef.
—	Met, Gly	—	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$	168—171	Äthanol-Äther	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$	C 38,37 H 5,64 ÄG 125	38,38 5,64 122
—	Pro, Gly	—	Formel V	167—172	Essigester- Petroläther	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}_2$	C 44,44 H 5,60	44,32 5,67
—	Try, Gly	—	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}$	161—163	Äthanol-Äther	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_3$	C 55,06 H 4,95 ÄG 152,5	54,97 5,12 153
<i>Hydantoin-3-essigsäuren (III) und -ester (VIII)</i>								
1	Met, Gly	—	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$	100—103	Äther-Petrol- äther	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$	ÄG 232	232
1a	Met, Gly	Äthyl	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2$	81—82	Äther	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$	C 46,15 H 6,20	46,12 6,19
2	S-Benzyl- Cys(SH), Gly .	—	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SCH}_2$	153—154	Wasser	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$	C 53,05 H 4,79	52,89 4,78
3	Ser, Gly	—	HOCH_2	222—226	Sublimiert 0,01 mm, 150°	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6\text{N}_2$	C 38,30 H 4,29 ÄG 198	37,32 3,98 210
4	Pro, Gly	—	Formel VI	Öl	Sdp.-0,01 : 170—190	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_2$	C 50,94	51,31
4a	Pro, Gly	Methyl	—	Öl	Sdp.-0,01 : 135—145	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2$	C 50,94 H 5,70 N 14,63 ÄG 287	51,31 5,98 14,52 285
5	Try, Gly	—	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}$	189—193	Essigester- Petroläther	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_3$	C 60,92 H 5,44	60,84 5,61
5a	Try, Gly	Äthyl	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}$	172—173	Essigester	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3$	C 47,02 H 4,79	47,76 5,04
6	His, Gly	Methyl	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2$	180—182	Methanol	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_4$		

Experimenteller Teil

Synthese der N-Cbzo-Dipeptidester (I) (Tabelle 2)

Für diese Synthesen seien 2 Beispiele angeführt:

a) *N-Cbzo-S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-äthylester (Methode C)*. 2,2 g N-Cbzo-S-benzyl-cystein¹⁹ wurden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und 1,6 g Dicyclohexyl-carbodiimid und 0,8 g Glycin-äthylester in 5 ml Tetrahydrofuran zugesetzt. Nach Stehen über Nacht wurde mit etwas Essigsäure versetzt und nach einiger Zeit vom ausgeschiedenen Dicyclohexyl-harnstoff abgesaugt. Nach Abdampfen des Filtrates wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Lösung mit verd. HCl, Sodalösung und Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über Natriumsulfat eingengt; Ausfällen mit Petroläther und Umkristallisieren aus Essigester lieferte 1,95 g des gewünschten Produktes. Eigenschaften siehe Tabelle 2.

b) *N-Cbzo-DL-Tryptophanyl-glycin-äthylester (Methode A)*. Eine Lösung von 1,4 g N-Cbzo-DL-Tryptophan in 20 ml absol. Tetrahydrofuran wurde mit 0,6 g Tri-n-propylamin versetzt, auf -10° gekühlt und 0,45 g Chlorameisensäure-äthylester zugesetzt. Nach 30 Min. bei -10° wurden 0,6 g Glycin-äthylester zugegeben und anschließend über Nacht bei Zimmertemp. stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte durch Filtrieren, Verdünnen des Filtrates mit Äther, Waschen der Lösung mit verd. HCl, Sodalösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat und Fällern mit Petroläther. Ausbeute und Eigenschaften siehe Tabelle 2.

Carbonyl-bisaminosäuren (II) aus den Cbzo-Peptiden (Tabelle 3)

Die Lösung des Cbzo-Dipeptidesters in Äthanol wird mit 2,1 Äquival. 1 n NaOH versetzt (Alkohol: Wasser etwa 1:1) und 2 bis 3 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Einengen der Lösung im Vak. zur Verteilung überschüssigen Alkohols wird mit HCl angesäuert (geringer Überschuß) und die Lösung mit Äther im Apparat extrahiert. Reinigung und Eigenschaften der Carbonyl-bisaminosäuren siehe Tabelle 3.

Hydantoin-3-essigsäuren (III) (Tabelle 3, Nr. 1, 2, 3, 4, 5 und 6)

Diese wurden — soweit die Carbonyl-bisaminosäuren rein vorlagen (Tabelle 3) — durch $\frac{1}{2}$ stünd. Erhitzen (Try-Derivat nur 5 Min.) mit HCl (1:1) und Abdampfen der Salzsäure im Vak. erhalten. Die Derivate des Met und Try wurden durch Umkristallisieren (Tabelle 3) rein erhalten, das Pro-Produkt (Nr. 4) wurde destilliert. In den anderen Fällen wurden die Rohprodukte der Laugeumlagerung mit HCl erhitzt, die Hydantoin-3-essigsäuren durch Ätherextraktion isoliert und nach der in der Tabelle 3 angegebenen Methode gereinigt. Beim His-Derivat (Nr. 6) wurde der Abdampfrückstand nach der Säurebehandlung gut getrocknet, mit Methanol-HCl verestert und der Ester in der üblichen Weise (Natriumcarbonat-Essigester) isoliert.

Synthese der Hydantoin-3-essigester (VIII) (Tabelle 3, Nr. 1a, 4a und 5a)

Hierzu wurden die entsprechenden Hydantoine (VII) in einer Na-äthoxyd- bzw. -methoxydlösung (1 Äquival. Na) 1 Std. zum Sieden erhitzt und anschließend mit der molaren Menge Bromessigsäure-ester (Äthyl- bei 1a und 5a, Methyl- bei 4a) weitere 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Zur Aufarbeitung wurde der Alkohol im Vak. abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Äther extrahiert. Reinigung und Eigenschaften siehe Tabelle 3.

¹⁹ C. R. Harington und T. H. Mead, Biochemic. J. **30**, 1598 (1936).

Die Aufspaltung dieser synthetischen Hydantoin-3-essigester zu den Carbonyl-bisaminosäuren (II) erfolgte durch Erhitzen (3 Stdn.) mit 2 Äquiv. NaOH, Ansäuern und Ätherextraktion. Zur Gewinnung der Hydantoin-3-essigsäuren (III) wurde mit 1 Äquiv. Alkali in Äthanol bei Zimmertemp. (über Nacht) verseift, der Äthanol im Vak. verdampft und weiter wie oben verfahren.

S-Benzylthioglykolsäure-äthylester (durch Behandlung von S-Benzylcystein-hydantoin (VII, $R = C_6H_5CH_2SCH_2$) mit Na-äthoxyd und Brom-essigester).

5-(Benzyl-thiomethyl)-hydantoin

1,5 g S-Benzyl-DL-Cystein wurden zusammen mit 0,9 g KCNO in 20 ml Wasser 30 Min. am Wasserbad erhitzt und nach Zusatz von 10 ml konz. HCl noch 15 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Einengen im Vak. und Kühlen schieden sich 1,3 g (77% d. Th.) ab, die aus Wasser umkristallisiert wurden. Schmp. 121 bis 123°.

$C_{11}H_{12}O_2N_2S$. Ber. C 55,86, H 5,12. Gef. C 55,65, H 5,10.

1,25 g dieses Hydantoin wurden in einer Na-äthoxydlösung (0,12 g Na in 15 ml absol. Äthanol) gelöst und nach 1 Std. am Wasserbad 0,9 g Brom-essigsäure-äthylester zugesetzt und noch weitere 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdampfen im Vak. wurde der Rückstand mit Wasser behandelt und das abgeschiedene Öl in Äther aufgenommen. Der Ätherrückstand (1,4 g) lieferte bei der Destillation im Kugelrohr (0,1 Torr, 110° Luftbadtemp.) 0,85 g (76% d. Th.) eines farblosen Öls. Die Lit.²⁰ gibt als Sdp. bei 23 Torr 179 bis 189° an.

$C_{11}H_{14}O_2S$. Ber. C 62,77, H 6,71. Gef. C 61,85, H 6,53.

Zur Identifizierung wurde ein Teil alkalisch verseift und die erhaltene Säure aus Äthanol-Wasser umkristallisiert. Schmp. 58 bis 61° (Lit.²⁰ Schmp. 58 bis 59°).

$C_9H_{10}O_2S$. Ber. C 59,31, H 5,53. Gef. C 58,78, H 5,63.

Weiters wurde aus dem Ester noch durch Behandeln mit fl. Ammoniak in Äthanol das Amid dargestellt. Aus Wasser Blättchen, Schmp. 95 bis 97° (Lit.²⁰ Schmp. 97°).

$C_9H_{11}ONS$. Ber. N 7,73. Gef. N 8,11.

Dihydrazid der Histidin-N-carbonsäure (IX, $R = C_4H_5N_3$)

0,6 g N-Cbzo-L-Histidin-methylester¹⁸ wurden in 2 ml absol. Äthanol in der Hitze gelöst, 0,75 g Hydrazinhydrat zugesetzt und die Mischung 5 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abdampfen des Äthanol und überschüssigen Hydrazins im Vak. wurde vom Rest des Hydrazins im Exsikkator über Schwefelsäure weitgehend befreit. Der zäh-glasige Rückstand wurde beim Behandeln mit Äthanol-Äther allmählich fest und konnte aus Äthanol-Äther-Petroläther umgefällt werden. Schmp. 163 bis 164° (ger. Zers.).

$C_7H_{13}O_2N_7$. Ber. N 43,15. Gef. N 42,72.

5-(Imidazolyl-methyl)-3-amino-hydantoin (X, $R = C_4H_5N_2$)

Wurde eine wäßr. Lösung des obigen Dihydrazides 30 Min. zum Sieden erhitzt und der Abdampfückstand aus Äthanol-Wasser umkristallisiert,

²⁰ S. Gabriel, Ber. dtsch. chem. Ges. 12, 1639 (1879).

dann erhielt man das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 60% d. Th. Kurze Nadeln, Schmp. 131 bis 134°, die Substanz wird beim weiteren Erhitzen allmählich fest, um dann bei 219 bis 221° zu schmelzen. Nach dem Trocknen des tiefer schmelzenden Produktes bei 100° im Hochvak. tritt nur mehr der hohe Schmp. auf.

$C_7H_9O_2N_5$. Ber. N 35,89. Gef. N 35,86.

Die analogen Derivate des Prolins wurden — ausgehend vom N-Cbzo-Prolinmethylester — auf dieselbe Weise erhalten. Sowohl das Dihydrazid als auch das Aminohydantoin waren Öle, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten.

Das Aminohydantoin ließ sich bei 0,01 Torr und 130 bis 140° (Luftbad-temp.) im Kugelrohr destillieren und erwies sich papierchromatographisch als einheitlich (Tabelle 1).

$C_6H_9O_2N_3$. Ber. N 27,09. Gef. N 25,34.

Abbau eines Cbzo-Dipeptides im Mikromaßstab

Der Abbau sei am Beispiel des Cbzo-Met-Gly-esters erläutert:

10 mg Cbzo-ester wurden mit einer Mischung aus 0,1 ml Äthanol und 0,054 ml (2 Mol) 1 n NaOH 3 Stdn. am Wasserbad erhitzt, der Abdampfrückstand in HCl (1:1) aufgenommen und 1 Std. unter Rückfluß gekocht. Es wurde erneut im Vak. zur Trockene gedampft und eine äquival. Menge am Papier 2mal chrom. (Bedingungen siehe S. 431). Ein Streifen wurde mit 4-Methyl-umbelliferon entwickelt (R_F : 0,44) und aus dem Parallelchromatogramm die Hydantoin-3-essigsäure mit Alkohol eluiert, das Eluat in einer Kapillare mit HCl hydrolysiert (4 Stdn. 140°) und das Hydrolysat erneut chromatographiert, wobei Met und Gly vorlagen⁷. Für die Bestimmung der N- und C-AS (Hydrazinabbau⁴) haben wir 5 mg Cbzo-Met-Gly mit 0,3 ml Hydrazinhydrat 5 Stdn. auf 100° erhitzt, das Hydrazin im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure abgedampft und den Abdampfrückstand in 0,5 ml Wasser aufgenommen. Ein Teil wurde am Papier chromatographiert und zeigte das Vorliegen von Gly (neben ganz schwachen verwaschenen Streifen). Nach Erhitzen der wäßr. Lösung zum Sieden (20 Min.) wurde erneut am Papier chromatographiert und mit Lauge und ammoniakal. Silbernitrat¹ das Aminohydantoin des Methionins (X, R = $CH_3SCH_2CH_2$) nachgewiesen (Vgl. mit einer authentischen Probe!). Außerdem lag daneben noch ein schwacher Fleck mit dem R_F -Wert des Gly-hydrazides (0,17) vor.

Quantitative Verfolgung der Laugeumlagerung I nach II

Sorgfältig gereinigte N-Cbzo-Dipeptide (nicht Ester) wurden in 2 Mol 0,1 n NaOH gelöst und die Lösung im Thermostaten auf 75° erhitzt. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen, rasch abgekühlt und durch Titration mit 0,1 n H_2SO_4 im Beckman-Autotitrator (Modell K) (Aufnahme der Titrationskurve) die Menge der überschüssigen Lauge bestimmt.

Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. G. Kainz im Mikrolaboratorium des II. Chemischen Institutes ausgeführt.

Herrn Dir. Prof. Dr. G. Ehrhardt von den Farbwerken Hoechst sind wir für die Überlassung von Aminosäuren zu großem Dank verpflichtet.

Dieser und anderen Arbeiten¹ kam eine Zuwendung zugute, welche die Rockefeller-Foundation einem von uns (F. W.) gewährt hat, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.