

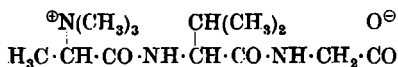
6. Richard Kuhn und Hans W. Ruelius: Über die Einwirkung von Diazomethan auf Peptide und Proteine

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg,
Institut für Chemie]

(Eingegangen am 20. Oktober 1951)

9 untersuchte Di- und Tripeptide reagierten in wäßriger Lösung mit gasförmigem Diazomethan unter Bildung der entsprechenden Trimethylbetaine. Intermediär traten dabei basisch reagierende Methylester auf. Im Falle des Glycyl-glycins erfolgte teilweise Dioxopiperazin-Bildung. Bei Einwirkung von gasförmigem Diazomethan auf wäßrige Lösungen von Serumalbumin und Ovalbumin erhält man anfangs steife Schäume, später methylimidhaltige, flockige Niederschläge, die in verdünnten Säuren und in verdünnten Alkalien unlöslich sind. Auf Ovoverdin- und Chloroplastin-Lösungen wirkt Diazomethan ähnlich wie Invertseifen (Farbumschlag nach Rot bzw. Freisetzung von Chlorophyll).

Die Tatsache, daß Di-, Tri- und höhere Peptide in wäßriger Lösung als Zwitter-Ionen vorliegen¹⁾, ließ auf Grund früherer Erfahrungen^{2,3)} erwarten, daß die Umsetzung mit Diazomethan als Endprodukt die entsprechenden Trimethylbetaine liefern werde. E. Abderhalden und H. Sichel⁴⁾ hatten bereits aus *d,l*-Leucyl-glycin⁵⁾ und Diazomethan das Trimethylbetain erhalten, doch scheinen weitere Beispiele nicht bekannt geworden zu sein. Nach eigenen Beobachtungen, die sich auf 6 Dipeptide und 3 Tripeptide beziehen, ist in allen Fällen das Trimethylbetain, das sich in guter Ausbeute kristallisiert isolieren läßt, Endprodukt der Reaktion (Tafel 1). Als Beispiel sei das aus *d,l*-Alanyl-*d,l*-valyl-glycin erhaltene Trimethyl-Derivat formuliert:



Ähnlich wie bei den einfachen Aminosäuren⁶⁾ wird auch im Falle der untersuchten Di- und Tripeptide die wäßrige Lösung nach einiger Zeit stark alkalisch (Bildung von Methylestern) und erst nach längerem Einleiten von Diazomethan wieder neutral. Mit der intermediären Bildung solcher Ester hängt offenbar unser Befund zusammen, daß man aus Glycyl-glycin und Diazomethan als Nebenprodukt in einer Ausbeute von 14% auch Glycinanhydrid erhalten kann (in 4 Versuchen 2 mal). Wie nämlich schon E. Fischer und E. Fourneau⁶⁾ festgestellt haben, bildet sich aus Glycyl-glycin-äthylester bereits beim Aufbewahren mit Wasser Diketo-piperazin.

¹⁾ J. Wyman, jr. u. T. L. McMeekin, Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 908 [1933].

²⁾ R. Kuhn u. W. Brydówna, B. **70**, 1333 [1937].

³⁾ R. Kuhn u. H. W. Ruelius, B. **83**, 420 [1950].

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **153**, 36 [1926].

⁵⁾ Anm. d. Redaktion: Die in dieser Arbeit benutzten Bezeichnungen *d* und *l* bedeuten im Sinne von Wohl und Freudenberg (B. **56**, 309 [1923]) die Konfiguration.

⁶⁾ B. **34**, 2873 [1901].

Bei der Einwirkung von ätherischen Diazomethan-Lösungen auf trockene Proteine sind mehr oder minder stark methoxyl- und methylimidhaltige Produkte erhalten worden⁷⁾. Interessanter erscheint die Einwirkung von gasförmigem Diazomethan auf wäßrige Lösungen kristallisierter Eiweißkörper (Serumalbumin, Ovalbumin). Dabei kommt es zur Bildung eines starken, sehr beständigen Schaumes, der sich nur schwer zerschlagen läßt. Bei längerer Einwirkung fallen flockige Methylierungsprodukte aus. Hier tritt das Diazomethan als Denaturierungsmittel in Erscheinung. Daß es auch methylierend wirkt, erkennt man daran, daß das Komplexbindungsvermögen des Serumalbumins für Kupfer-Ionen völlig verloren geht (Verlust der Retentionsfähigkeit).

Hummereier und Ovoverdin-Lösungen sowie Lösungen von Chloroplastin verhalten sich gegen Diazomethan ähnlich wie gegen Invertseifen⁸⁾: die farbigen prosthetischen Gruppen werden in Freiheit gesetzt. Extrahiert man reife Paprika-Früchte mit $m/_{50}$ Phosphatpuffer von pH 7.3, so erhält man gelbrote Lösungen, die an Benzin, Benzol und Toluol keinen Farbstoff abgeben. Nach Einwirkung von Diazomethan lassen sich, wie auch nach Zusatz von Invertseifen, die Carotinoide mit den genannten Lösungsmitteln ausschütteln.

Für eifrige und geschickte Unterstützung haben wir Frln. A. Seeliger zu danken, für Hilfe bei einzelnen Versuchen Frln. A. Theis.

Beschreibung der Versuche

Einwirkung von Diazomethan auf Peptide

Glycyl-glycin-betain: In die auf 0° gekühlte Lösung von 1 g Glycyl-glycin (Hoffmann-La Roche) in 5 ccm Wasser wurde Diazomethangas eingeleitet, das auf die früher⁹⁾ beschriebene Art von Lösungsmittel befreit war. Nach kurzer Zeit reagierte die Peptid-Lösung stark alkalisch; den zeitlichen Verlauf des Entstehens und Verschwindens der Peptidester zeigen folgende Werte, die durch Titration aliquoter Teile der Methylierungs-Lösung mit $n/_{10}$ HCl (Bromphenolblau) zu den angegebenen Zeiten erhalten wurden:

Minuten nach Beginn	6	10	17	22	29	41
% Ester	24	33	53	48	32	19

Nachdem Diazomethan aus etwa 45 g Nitroso-methyl-harnstoff eingeleitet war (in etwa 2½ Std.), reagierte die wäßr. Lösung annähernd neutral (pH 7.5–8) und gab beim Kochen mit Kupfercarbonat keine Färbung mehr. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft; der sirupöse Rückstand kristallisierte i. Vak.-Exsiccator über Diphosphorpentoxyd. Die stark hygroskopische Kristallmasse wurde in etwa 25 ccm heißem absol. Methanol gelöst. Nach Zugabe von etwa 150 ccm wasserfreiem Aceton kristallisierte das Glycyl-glycin-betain in langen, dünnen Prismen, bzw. dreiseitigen Pyramiden; Ausb. 0.66 g (50% d. Th.) vom Schmp. 228° (Zers.)^{9,10,11)}. Zur Analyse wurde i. Vak. bei 110° bis zur Gewichts-

⁷⁾ K. Landsteiner, Biochem. Ztschr. 58, 362 [1914]; J. Herzig u. K. Landsteiner, Biochem. Ztschr. 61, 458 [1914]; J. Herzig u. H. Lieb, Ztschr. physiol. Chem. 117, 1 [1921]. ⁸⁾ R. Kuhn u. H.-J. Bielig, B. 73, 1080 [1940].

⁹⁾ Alle Schmelzpunkte im Kupferblock nach Berl, unkorrt.

¹⁰⁾ A. Kossel u. S. Edlbacher, Ztschr. physiol. Chem. 107, 45 [1919], geben für freies Glycyl-glycin-betain den Schmp. 141° an. Wir fanden, daß wasserhaltiges Glycyl-glycin-betain zwischen 125 und 140° (je nach Erhitzungsgeschwindigkeit und Temperatur des „Einwerfens“) im Kristallwasser schmilzt, dann wieder fest wird und erneut bei 228° (Zers.) schmilzt.

¹¹⁾ Nach T. Imai, Ztschr. physiol. Chem. 186, 192 [1924], liegt der Schmelzpunkt bei 238–239° (Zers.).

konstanz getrocknet. Die Substanz wurde wie alle folgenden freien Betaine in Gefäßen mit eingeschliffenem Stöpsel zur Wägung gebracht.

$C_3H_{14}O_3N_2$ (174.1) Ber. C 48.24 H 8.10 N 16.09 Gef. C 48.09 H 8.21 N 16.10

Glycinanhydrid (2,5-Dioxo-piperazin): Bei 2 Versuchen (je 1 g Glycyl-glycin in 5 ccm Wasser) schied sich kurze Zeit nach Beginn der Diazomethan-Einwirkung eine in Wasser schwer lösliche, kristalline Substanz ab (90 mg). Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert. Prismen vom Schmp. 308° (Zers.)¹²⁾. Die Debye-Scherrer-Aufnahme zeigte die Identität mit Glycinanhydrid.

$C_4H_8O_2N$ (114.1) Ber. C 42.18 H 5.31 N 24.62 Gef. C 41.90 H 5.39 N 24.66

Tafel I. Di- und Tripeptid-betaine

Verbindung Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse (Substanzen bei 110° i. Vak. getr.)	Ansatz g in ccm Wasser	Ausb. % d.Th. a)	um- krist. aus b)	Zers.- punkt c)
Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -alanin-betain $C_3H_{16}O_3N_2$ (188.1)	Ber. C 51.03 H 8.57 N 14.87 Gef. C 50.83 H 8.61 N 15.02	0.5 in 3	61	B D	227°
Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -valin-betain $C_{10}H_{20}O_3N_2$ (216.2)	Ber. C 55.51 H 9.32 N 12.96 Gef. C 55.54 H 9.80 N 13.22	0.5 in 3	57	A	228°
Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -leucin-betain $C_{11}H_{22}O_3N_2$ (230.2)	Ber. C 57.34 H 9.63 N 12.17 Gef. C 57.38 H 9.76 N 12.05	0.5 in 3	56	A	219° ¹³⁾
Glycyl- <i>l</i> -leucin-betain $C_{11}H_{22}O_3N_2$ (230.2)	Ber. C 57.34 H 9.63 N 12.17 Gef. C 57.29 H 9.97 N 11.97	0.25 in 2	55	C	246°
<i>d</i> , <i>l</i> -Alanyl-glycin-betain $C_8H_{16}O_3N_2$ (188.1)	Ber. C 51.03 H 8.57 N 14.87 Gef. C 50.92 H 8.69 N 15.02	0.5 in 3	59	D	235° ¹⁴⁾
Glycyl-glycyl-glycin- betain $C_9H_{17}O_4N_3$ (231.2)	Ber. C 46.72 H 7.41 N 18.18 Gef. C 46.79 H 7.30 N 18.10	0.7 in 4	43	A D	199.5° ¹⁵⁾
<i>d</i> , <i>l</i> -Alanyl- <i>d</i> , <i>l</i> -valyl-gly- cin-betain $C_{13}H_{23}O_4N_3$ (287.2)	Ber. C 54.32 H 8.77 N 14.63 Gef. C 54.42 H 8.95 N 14.43	0.3 in 3.5	72	D	178°
Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -valyl- <i>d</i> , <i>l</i> -ala- nin-betain $C_{13}H_{25}O_4N_3$ (287.2)	Ber. C 54.32 H 8.77 N 14.63 Gef. C 54.51 H 9.06 N 14.98	0.25 in 3	42	D	175°

a) Ausbeute an analysenreiner Substanz. Aus den Mutterlängen lassen sich weitere Mengen der betreffenden Betaine gewinnen.

b) In dieser Spalte bedeutet: A = absol. Alkohol, B = absol. Alkohol + wasserfreier Äther, C = absol. Alkohol + wasserfreies Aceton, D = absol. Methanol + wasserfreies Aceton.

c) Die Zersetzungspunkte hängen sehr stark von der Erhitzungsgeschwindigkeit ab. Die angegebenen Werte beziehen sich auf langsames Erwärmen (1–2° je Min.). Bei raschem Erhitzen findet man wesentlich höhere Zersetzungspunkte, die aber noch schlechter reproduzierbar sind.

¹²⁾ Literaturangabe für Glycinanhydrid: Schmp. 311–312° (Zers.) (R. Kempf, Journ. prakt. Chem. [2] 78, 244 [1908]).

¹³⁾ E. Abderhalden u. F. Schweitzer fanden für dieses Betain den Schmp. 236 bis 237° (Zers.) (Fermentforsch. 18, 128 [1933]).

¹⁴⁾ Von A. Kossel u. S. Edlbacher (Fußn. ¹⁰⁾) als nicht kristallisierender Sirup erhalten.

¹⁵⁾ E. Abderhalden u. K. Kautzsch, Ztschr. physiol. Chem. 75, 19 [1911], sowie T. Imai (s. Fußn. ¹¹⁾) erhielten das Chloroplatinat dieses Betains.

Das Filtrat vom Glycinanhydrid wurde i. Vak. zur Trockne verdampft. Beim Aufnehmen des Rückstandes in heißem Methanol blieben weitere 30 mg Glycinanhydrid unlöslich. Aus der methanol. Lösung kristallisierte nach Zusatz von Aceton Glycyl-glycin-betain aus, wie in den Versuchen, bei denen keine Bildung von Glycinanhydrid stattgefunden hatte.

Glycyl-glycin-betain-chloroaurat: Die Lösung von 95 mg Glycyl-glycin-betain in 2 ccm *n* HCl wurde mit überschüss. Goldchlorwasserstoffsäure versetzt. Der zunächst ölige Niederschlag kristallisierte im Eisschrank (230 mg). Zur Analyse wurde aus Wasser, dem einige Tropfen verd. Salzsäure und eine Spur Goldchlorwasserstoffsäure zugefügt waren, umkristallisiert. Große, gelbe Prismen vom Schmp. 148–150° (langsam erwärmt)¹⁶⁾.

$[C_7H_{15}O_3N_2]_2AuCl_4$ (514.2) Ber. C 16.34 H 2.94 N 5.45 Au 38.35
Gef. C 16.49 H 2.89 N 5.27 Au 38.27

Glycyl-glycin-betain-hexachloroplatinat: Zur Lösung von 50 mg Glycyl-glycin-betain in 2 ccm 94-proz. Alkohol wurden 0.8 ccm 10-proz. alkohol. Platinchlorwasserstoffsäure-Lösung gegeben. Ockergelbe, kleine Prismen (96 mg) vom Schmp. 193° (Zers.)¹⁷⁾.

$[C_7H_{15}O_3N_2]_2PtCl_6$ (758.2) Ber. C 22.16 H 3.99 N 7.39 Pt 25.75
Gef. C 22.32 H 3.88 N 7.17 Pt 25.90

Auf die gleiche Art und Weise wie das Glycyl-glycin-betain wurden die in der Tafel 1 aufgeführten Betaine aus den entsprechenden Di- und Tripeptiden gewonnen. Wie beim Glycyl-glycin traten auch hier intermediär die entsprechenden Ester auf.

Mit Ausnahme des Glycyl-*l*-leucins waren alle umgesetzten Peptide optisch inaktiv. Glycyl-*l*-leucin-betain ist in Wasser linksdrehend; $[\alpha]_D^{20}$: $-1.20^\circ \times 100 / 2.01 \times 2 = -29.8^\circ$.

Tafel 2. Chloroaurate von Di- und Tripeptid-betainen

Verbindung Formel (Mol.-Gew.)	Analyse	Schmp.
Glycyl- <i>d,l</i> -alanin-betain-chloroaurat $C_8H_{17}O_3N_2 \cdot AuCl_4$ (528.2)	Ber. C 18.18 H 3.24 N 5.30 Au 37.33 Gef. C 18.23 H 3.22 N 5.13 Au 37.69	144° (Zers.)
Glycyl- <i>d,l</i> -valin-betain-chloroaurat $C_{10}H_{21}O_3N_2 \cdot AuCl_4$ (556.2)	Ber. C 21.57 H 3.80 N 5.04 Au 35.45 Gef. C 21.67 H 3.86 N 4.78 Au 35.28	92–93°
Glycyl- <i>d,l</i> -leucin-betain-chloroaurat $C_{11}H_{23}O_3N_2 \cdot AuCl_4$ (570.2)	Ber. C 23.15 H 4.07 N 4.91 Au 34.58 Gef. C 23.04 H 4.27 N 4.80 Au 34.46	116–117°
Glycyl- <i>l</i> -leucin-betain-chloroaurat $C_{11}H_{23}O_3N_2 \cdot AuCl_4$ (570.2)	Ber. C 23.15 H 4.07 N 4.91 Au 34.58 Gef. C 23.22 H 4.07 N 4.68 Au 33.92	125–126°
<i>d,l</i> -Alanyl-glycin-betain-chloroaurat $C_8H_{17}O_3N_2 \cdot AuCl_4$ (528.2)	Ber. C 18.18 H 3.24 N 5.30 Au 37.33 Gef. C 18.17 H 3.13 N 5.01 Au 37.13	106–107° ¹⁸⁾
Glycyl-glycyl-glycin-betain-chloroaurat $C_9H_{18}O_4N_3 \cdot AuCl_4$ (571.2)	Ber. C 18.91 H 3.18 N 7.36 Au 34.52 Gef. C 18.73 H 3.13 N 7.38 Au 34.20	150° (Zers.)
<i>d,l</i> -Alanyl- <i>d,l</i> -valyl-glycin-betain-chloroaurat $C_{13}H_{26}O_4N_3 \cdot AuCl_4$ (627.3)	Ber. C 24.87 H 4.18 N 6.70 Au 31.44 Gef. C 24.95 H 4.23 N 6.48 Au 31.50	170° (Zers.)
Glycyl- <i>d,l</i> -valyl- <i>d,l</i> -alanin-betain-chloroaurat $C_{13}H_{26}O_4N_3 \cdot AuCl_4$ (627.3)	Ber. C 24.87 H 4.18 N 6.70 Au 31.44 Gef. C 24.92 H 4.23 N 6.62 Au 31.21	168° (Zers.)

¹⁶⁾ Nach A. Kossel u. S. Edlbacher, vergl. Fußn. ¹⁰⁾, liegt der Schmelzpunkt des Glycyl-glycin-betain-chloroaurats bei 155°.

¹⁷⁾ Literaturangabe für Glycyl-glycin-betain-hexachloroplatinat: Schmp. 210–211° (T. Imai, s. Fußn. ¹¹⁾).

¹⁸⁾ Das von A. Kossel und S. Edlbacher¹⁰⁾ erhaltene Chloroaurat des *d,l*-Alanyl-glycin-betains hatte die Zusammensetzung des Monohydrats $C_8H_{19}O_4N_2 \cdot AuCl_4$, Schmp. 105° (nach Sintern bei 90°).

Zur Charakterisierung der dargestellten Peptid-betaine fanden wir die Chloroaurate am geeignetsten. Sie sind „normal“ zusammengesetzt, d. h. auf 1 Mol. Betain kommt 1 Mol. HAuCl_4 . Die Hexachloroplatinate $(\text{Betain})_2\text{H}_2\text{PtCl}_6$ sind in Wasser leicht löslich; sie können aus alkohol. Lösung gefällt und umkristallisiert werden. Die in einigen Fällen dargestellten Hydrochloride erwiesen sich als hygroskopisch.

Zur Fällung mit Goldchlorwasserstoffsäure wurden die Peptid-betaine in der 7–25-fachen Menge 1–2 *N* HCl gelöst. Beim Stehen im Eisschrank erfolgte in allen Fällen Kristallisation der zunächst oft ölig ausfallenden Chloroaurate. Zur Analyse wurde aus Wasser unter Zusatz von etwas Goldchlorid und Salzsäure umkristallisiert und bei 56° i. Vak. getrocknet (Tafel 2).

Glycyl-*d,l*-valin-betain-hexachloroplatinat: Die Lösung von 50 mg Glycyl-*d,l*-valin-betain in 2 ccm 94-proz. Alkohol wurde mit 0.8 ccm 10-proz. alkohol. Platinchlorwasserstoffsäure versetzt. Zur Analyse wurde aus wäßr. Alkohol umkristallisiert. Hellgelbe, feine Nadeln (65 mg) vom Schmp. 210° (Zers.).

$[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}_2]_2\text{PtCl}_6$ (842.3) Ber. C 28.49 H 5.03 N 6.65 Pt 23.18

Gef. C 28.48 H 4.86 N 6.39 Pt 23.33

Glycyl-*d,l*-alanin-betain-hydrochlorid: Zur Lösung von 77 mg Glycyl-*d,l*-alanin-betain in 1.2 ccm absol. Alkohol wurden 0.15 ccm 20-proz. absol. alkohol. Salzsäure gegeben. Nach Zusatz von wasserfreiem Äther bis zur bleibenden Trübung schieden sich in der Kälte kleine Nadeln ab, die aus absol. Alkohol umkristallisiert wurden (52 mg); Schmp. 213–215° (Zers.). Zur Analyse wurde die hygroskopische Substanz bei 56° i. Vak. getrocknet.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$ (224.6) Ber. C 42.74 H 7.63 N 12.47 Gef. C 42.40 H 7.75 N 12.37

Glycyl-glycyl-glycin-betain-hydrochlorid wurde aus Glycyl-glycyl-glycin-betain auf die gleiche Weise wie die vorstehende Verbindung erhalten. Die hygroskopische Substanz kristallisierte aus Alkohol + Äther in zu Drusen vereinigten Prismen vom Schmp. 198° (Zers.). Zur Analyse wurde i. Vak. bei 56° getrocknet.

$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ (267.7) Ber. C 40.34 H 6.78 N 15.70 Gef. C 40.53 H 6.60 N 15.29

Darstellung der Peptide

Die Darstellung der für die Umsetzung mit Diazomethan benötigten Peptide erfolgte teils nach dem Verfahren von Th. Wieland und R. Sehring¹⁹⁾ über die Anhydride aus Benzoessäure und Carbobenzoxym-aminosäuren, teils über die gemischten Anhydride, die nach Th. Wieland und H. Bernhard²⁰⁾ bzw. R. A. Boissonnas²¹⁾ aus Carbobenzoxym-aminosäuren und Chlorkohlensäureestern entstehen. Bei der letztgenannten Methode erwies es sich als besonders günstig, die Lösung der gemischten Anhydride mit dem Äthylester der Aminosäure bzw. des Peptids umzusetzen und den Äthylrest nachträglich abzuspalten²¹⁾. Aus den Carbobenzoxym-peptiden wurden die freien Peptide durch hydrierende Spaltung nach M. Bergmann und L. Zervas²²⁾ gewonnen.

Soweit die Darstellung der betreffenden Peptide nach diesen Methoden noch nicht beschrieben ist, wird sie im folgenden kurz geschildert.

Carbobenzoxym-*d,l*-valin wurde auf die gleiche Art dargestellt wie Carbobenzoxym-glycin²³⁾. Das ölig ausfallende Rohprodukt kristallisierte im Eisschrank nach mehrmaligem Verreiben mit Wasser; Ausb. an kristallisierter Substanz 80% d. Theorie. Zur Analyse wurde aus Benzol + Petroläther (Sdp. 40–50°) oder Methanol + Wasser umkristallisiert; Schmp. 74–75°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}$ (251.1) Ber. C 62.13 H 6.82 N 5.58 Gef. C 62.02 H 6.78 N 5.65

Carbobenzoxym-*d,l*-valyl-glycin-äthylester: Die Lösung von 3.8 g Carbobenzoxym-valin und 2.1 ccm *N*-Äthyl-piperidin in 20 ccm reinem Dioxan wurde bei 10°

¹⁹⁾ Th. Wieland u. R. Sehring, A. 569, 122 [1950].

²⁰⁾ Th. Wieland u. H. Bernhard, A. 572, 190 [1951].

²¹⁾ R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 34, 874 [1951].

²²⁾ B. 65, 1192 [1932].

²³⁾ Org. Syntheses 23, 14 [1943].

mit 1.43 cem Chlorkohlensäure-äthylester versetzt. Der Geruch nach Chlorkohlensäure-äthylester war fast augenblicklich verschwunden; es wurde dann sofort eine Mischung von 2.1 g Glycin-äthylester-hydrochlorid und 2.1 cem *N*-Äthyl-piperidin in 20 cem Dioxan zugegeben. Nach 30 Min. wurde in 120 cem Wasser von 0° gegossen. Nach kurzem Stehen in der Kälte kristallisierte der Carbobenzoxo-*d,l*-valyl-glycin-äthylester in farblosen Nadeln aus; Ausb. 4 g (79% d.Th.). Zur Analyse wurde aus Alkohol umkristallisiert; Schmp. 144–145°.

$C_{17}H_{24}O_6N_2$ (336.2) Ber. C 60.68 H 7.19 N 8.33 Gef. C 60.79 H 7.20 N 8.62

Carbobenzoxo-*d,l*-alanyl-*d,l*-valyl-glycin-äthylester: 2 g Carbobenzoxo-*d,l*-valyl-glycin-äthylester wurden in 65 cem absol. Alkohol gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß i. Ggw. von 2 g 2-proz. Palladium-Bariumsulfat hydriert. Der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. zurückbleibende sirupöse *d,l*-Valyl-glycin-äthylester wurde in 7 cem Dioxan aufgenommen und sofort mit einer Anhydridlösung umgesetzt, die aus 1.33 g Carbobenzoxo-alanin und 0.56 g Chlorkohlensäure-äthylester in 7 cem Dioxan und 0.81 cem *N*-Äthyl-piperidin bereitet worden war. Nach 30 Min. wurden 40 cem Wasser von 0° zugegeben. Nach wenigen Min. fiel der Carbobenzoxo-alanyl-valyl-glycin-äthylester aus; Ausb. 2 g = 82% d.Theorie. Zur Analyse wurde aus Methanol + Wasser umkristallisiert; Nadeln vom Schmp. 155–156°.

$C_{20}H_{26}O_6N_3$ (407.3) Ber. C 58.93 H 7.18 N 10.32 Gef. C 59.18 H 6.98 N 10.36

d,l-Alanyl-*d,l*-valyl-glycin-äthylester: 1.6 g Carbobenzoxo-alanyl-valyl-glycin-äthylester wurden in absol. Alkohol (60 cem) gelöst und unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit i. Ggw. von 1.6 g 2-proz. Palladium-Bariumsulfat hydrierend gespalten. Der Abdampfückstand war fest; er konnte aus Benzol + Benzin (Sdp. 40–50°) in feinen Nadelchen vom Schmp. 118–119° erhalten werden.

d,l-Alanyl-*d,l*-valyl-glycin: 1.3 g-roher *d,l*-Alanyl-*d,l*-valyl-glycin-äthylester wurden in 19 cem 0.25 *n* Ba(OH)₂ gelöst und über Nacht stehen gelassen. Nach Fällung des Bariums mit 0.1 *n* H₂SO₄ wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung i. Vak. zur Trockne verdampft. Das freie Tripeptid kristallisierte aus wäbr. Alkohol in kleinen Prismen vom Schmp. 228° (Zers.)²⁴.

$C_{10}H_{19}O_4N_3$ (245.2) Ber. C 48.94 H 7.81 N 17.14 Gef. C 48.64 H 7.96 N 17.37

Carbobenzoxo-glycyl-*d,l*-valin: Die auf 0° gekühlte Lösung von 10.4 g Carbobenzoxo-glycin in 100 cem gereinigtem Tetrahydrofuran wurde mit 5.6 g *N*-Äthyl-piperidin und 2.7 g Chlorkohlensäure-äthylester versetzt. Sobald der Geruch nach Chlorkohlensäureester verschwunden war, wurden unter kräftigem Schütteln 6 g Valin, gelöst in 25 cem 2 *n* NaOH, zugegeben. Nach Beendigung der Kohlendioxyd-Entwicklung (nach etwa 20 Min.) wurde i. Vak. zur Trockne gedampft, in wenig Wasser aufgenommen und mit verd. Salzsäure angesäuert. Der zunächst ölig ausgefallene Niederschlag kristallisierte nach einigen Stunden in der Kälte. Ausb. 13 g an noch sehr unreinem Carbobenzoxo-glycyl-valin. Durch mehrmaliges, sehr verlustreiches Umkristallisieren aus Äthylacetat bzw. Methanol + Wasser stieg der Schmp. auf 145°¹⁹.

Carbobenzoxo-glycyl-*d,l*-valyl-*d,l*-alanin: Zur Lösung des gemischten Anhydrids aus 3.1 g Carbobenzoxo-glycyl-valin und 0.8 cem Chlorkohlensäure-äthylester in 30 cem Tetrahydrofuran und 1.1 g *N*-Äthyl-piperidin wurden unter kräftigem Schütteln 0.9 g Alanin in 5 cem 2 *n* NaOH gegeben und wie oben beschrieben weiterverarbeitet; Rohausb. 2.9 g. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol + Wasser lag der Schmp. bei 199–201°.

$C_{18}H_{25}O_6N_3$ (379.2) Ber. C 56.96 H 6.64 N 11.08 Gef. C 56.91 H 6.56 N 11.00

Glycyl-*d,l*-valyl-*d,l*-alanin: Dieses Tripeptid entsteht aus der Carbobenzoxo-Verbindung durch hydrierende Spaltung in 50-proz. Methanol. Das Rohprodukt wurde aus Wasser + Aceton umkristallisiert; Schmp. 252° (Zers.).

$C_{10}H_{19}O_4N_3$ (245.2) Ber. C 48.94 H 7.81 N 17.14 Gef. C 49.17 H 7.28 N 16.88

²⁴) Literaturangaben für *d,l*-Alanyl-*d,l*-valyl-glycin: Schmp. 248° (Zers.) (E. Abderhalden u. O. Herrmann, Fermentforsch. 10, 151 [1929]) und Schmp. 241° (Zers.) (St. Goldschmidt u. K. Strauss, A. 471, 12 [1929]).

Carbobenzoxo-glycyl-*d,l*-leucin wurde entsprechend der Vorschrift für Carbobenzoxo-glycyl-*d,l*-alanin¹⁹⁾ dargestellt. Das Rohprodukt wurde 3 mal mit Benzin (Sdp. 50–60°) ausgekocht und aus Chloroform umkristallisiert. Glänzende Schuppen vom Schmp. 125–126°.

$C_{16}H_{22}O_5N_2$ (322.2) Ber. C 59.59 H 6.88 N 8.70 Gef. C 59.43 H 6.83 N 8.90

Die übrigen verwendeten Peptide waren Handelspräparate (Hoffmann-La Roche).

Einwirkung von Diazomethan auf Proteine

Rinderalbumin. a) in Lösung: Beim Einleiten von Diazomethangas in die 4-proz. wäbr. Lösung von krist. Rinderalbumin II (Behringwerke, Marburg) bildete sich zunächst ein sehr steifer Schaum. Nach einiger Zeit schieden sich weiße Flocken ab. Die ausgeflockte Substanz war weder in verd. Salzsäure noch in verd. Natronlauge löslich.

b) auf Papier: Eine 2-proz. wäbr. Rinderalbumin-Lösung wurde in Form etwa 8.5 cm langer und 0.8 cm breiter Streifen wie bei der „verbesserten Retentionstechnik“ nach Th. Wieland^{25, 26)} auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Nach dem Trocknen an der Luft wurde das Papier 20 Stdn. der Einwirkung von Diazomethangas ausgesetzt (Exsiccator mit Diazomethan-Lösung in Toluol). Zur Kontrolle wurde ein zweites, ebenso vorbereitetes Blatt für die gleiche Zeit in eine toluolhaltige Atmosphäre gebracht, ein drittes Blatt blieb vollkommen unbehandelt. Die Bindung der Kupfer-Ionen ließ sich wie bei der Retentionsanalyse²⁷⁾ zeigen: im Papier wurde in der Längsrichtung der aufgetragenen Rinderalbuminstreifen eine 0.1-proz. Kupferacetat-Lösung in 5% wasserhaltigem Tetrahydrofuran aufsteigen gelassen. Nach Besprühen mit Rubeanwasserstoff-Lösung zeigten sich über dem Rinderalbumin, das der Wirkung von Diazomethandämpfen ausgesetzt worden war, keine Retentionslücken, während auf den beiden Kontrollblättern die Lücken in der Kupferfront gleich groß waren. Durch die Diazomethan-Einwirkung war also das Bindungsvermögen des Serumalbumins für Kupfer-Ionen vollständig verlorengegangen.

Ovalbumin: Beim Einleiten von Diazomethangas in eine 1-proz. wäbr. Lösung von krist. Ovalbumin (durch Dialyse salzfrei gemacht) schieden sich nach kurzer Zeit weiße Flocken aus der stark schäumenden Flüssigkeit ab. Die Flocken konnten durch Zusatz von verd. Essigsäure, verd. Salzsäure oder verd. Natronlauge nicht wieder in Lösung gebracht werden. Beim Stehenlassen in 1 *n* NaOH gingen die Flocken nach etwa 20 Stdn. wieder in Lösung.

Paprikafarbstoff: Fruchtfleisch und Haut einer reifen, roten Paprikafrucht (*Capsicum annuum*) wurden in kleine Stücke geschnitten und in einem Glasapparat bei 0° homogenisiert. Der entstandene dicke, rote Brei wurde mit dem gleichen Vol. *m/50* Phosphatpuffer vom *pH* 7.3 vermischt und zentrifugiert (15000 Umdrehungen/Min.). Die überstehende trübe Flüssigkeit war kräftig gelbrot gefärbt, der Bodensatz enthielt fast keinen roten Farbstoff. Die gelbrote Lösung gab auch bei längerem Schütteln keinen Farbstoff an Benzin oder Toluol ab. An Äther hingegen wurde der Farbstoff langsam abgegeben. Nach Zusatz von Invertseife (Zephirol) ließ sich der gesamte Farbstoff auch mit Benzin oder Toluol ausschütteln. Die Toluollösung zeigte im Gittermeß-Spektroskop nach Loewe-Schumm zwei breite, unscharfe Banden mit den Schwerpunkten bei 486 und 456 *mμ*.

Zur Hauptmenge der zentrifugierten, wäbr. Farbstoff-Lösung wurde bei 0° unter raschem Rühren Diazomethan, in Toluol gelöst, zugetropft. Nach 10 Min. Rühren wurden die Schichten durch Zentrifugieren rasch getrennt. Die Toluolschicht war gelb und zeigte die gleichen Absorptionsbanden wie die durch Invertseifenspaltung gewonnene Carotinoid-Lösung. Die wäbr. Schicht war nur noch schwach gelblich gefärbt; an der Phasengrenze hatten sich elfenbeinfarbene Flocken angesammelt.

²⁵⁾ Th. Wieland u. J. Wirth, *Angew. Chem.* **62**, 473 [1950].

²⁶⁾ Th. Wieland u. L. Wirth, *Angew. Chem.* **63**, 171 [1951].

²⁷⁾ Th. Wieland u. E. Fischer, *Naturwiss.* **35**, 29 [1948]; Th. Wieland, *Angew. Chem.* [A] **60**, 313 [1948].

Chloroplastin: Aus klein geschnittenen Spinatblättern wurde durch Verreiben mit der doppelten Menge $m/_{50}$ Phosphatpuffer vom p_H 7.3 (Eiskühlung) und Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/Min. eine tiefdunkelgrüne Chloroplastin-Lösung gewonnen²⁸⁾. Diese gab an Benzol nur geringe Mengen gelber Farbstoffe, jedoch keinen grünen Farbstoff ab.

Beim Verrühren mit einer Diazomethan-Lösung in Toluol ging der gesamte grüne Farbstoff in die Toluolschicht. Die Bandenschwerpunkte lagen bei 664, 619, 579, 484, 461 und 436 $m\mu$. Die gleichen Banden zeigte eine Chlorophyll-Lösung in Benzol bzw. Toluol, die durch Spaltung der Chloroplastin-Lösung mit Lauryl-dimethyl-benzyl-ammoniumbromid hergestellt worden war²⁹⁾.

Hummerfarbstoffe: Eine dialysierte Ovoverdin-Lösung nach K. G. Stern und K. Salomon²⁹⁾ wurde unter Rühren zu einer eisgekühlten Lösung von Diazomethan in Benzin (Sdp. 40–60°) getropft. Die grüne Farbe verschwindet fast augenblicklich, es bildet sich ein leicht rot gefärbter Schaum. Durch Zentrifugieren erhält man eine schwach gelbrot gefärbte Benzinschicht, die keine scharfen Banden zeigt. Bei der Verteilungsprobe mit 90-proz. Methanol geht fast der gesamte Farbstoff in die untere Phase.

Werden ganze Hummereier mit Diazomethan-Lösung übergossen, so findet eine heftige Gasentwicklung statt, die Eier quellen, die dunkelgrüne Farbe schlägt nach Rot um, ohne daß Farbstoff an Benzin abgegeben wird.

Ein Stück vom Schwanzfächer eines Hummers wurde in einer Benzinlösung von Diazomethan innerhalb 2 Stdn. vollständig rot. In reinem Benzin blieb die blaue Farbe des Panzers tagelang erhalten.

In einer diazomethanhaltigen Atmosphäre (Exsiccator in dem sich Diazomethan-Lösung in Benzin befand) färbten sich Eier und Stücke des Panzers bald rot. Nach 6 Stdn. war der Farbumschlag vollständig.

7. Friedrich Weygand und Ernst Csendes: Eine Nachweismethode für Endiole und Enole der 1.3-Diketone

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 30. Oktober 1951)

Endiole reagieren mit Titan(III)-chlorid in pyridinhaltiger methanolischer Lösung beim Schütteln an der Luft unter Bildung ziegelroter bis blutroter Färbungen oder Niederschläge. Verbindungen, die unter den Reaktionsbedingungen zu Endiolen reduziert werden (z.B. Dehydroascorbinsäure oder o-Chinone) geben die gleiche Reaktion. Die Konstitution der entstehenden Titan(IV)-Komplexe wurde an den aus Brenzcatechin und Ascorbinsäure entstehenden Verbindungen untersucht.

Enole von 1.3-Diketonen reagieren in methanolischer Lösung mit Titan(III)-chlorid und ergeben dunkelblaue bis dunkelgrüne Färbungen, die stark luftempfindlichen Titan(III)-Komplexen zuzuschreiben sind.

In der Literatur ist bereits gelegentlich über die Umsetzung von Titansalzen mit oxygruppenhaltigen Verbindungen berichtet worden. J. Piccard¹⁾ hat beobachtet, daß Brenzcatechin in wäßriger Lösung bei Zusatz von Titan(III)-chlorid eine gelborange Färbung, bei nicht zu großer Verdünnung einen rotbraunen Niederschlag liefert. Ähnliche Feststellungen machte H. J. H. Fenton²⁾ bei der Dioxymaleinsäure. A. Monier³⁾ hat

²⁸⁾ Vergl. A. Stoll u. E. Wiedemann, Ber. X. Internat. Chemiekongreß Rom 5, 206 [1938/39]. ²⁹⁾ Journ. biol. Chem. 122, 461 [1937/1938].

¹⁾ B. 42, 4343 [1909].

²⁾ Journ. chem. Soc. London 93, 1064 [1908].

³⁾ Ann. Chim. analyt. 20, 1 [1915] (C. 1916 I, 638).