

Benzyl-*n*-butyl-pyrophosphorsäure: 5.6 g (10 mMol) Silbersalz der Tribenzylpyrophosphorsäure werden unter Kühlung zu einer Mischung von 3 g *n*-Butyljodid und 15 ccm Chloroform zugegeben und das Ganze erst 5–6 Std. bei gewöhnl. Temperatur geschüttelt und dann 2 Std. rückfließend gekocht. Es wird von den Silbersalzen filtriert, mit viel Chloroform gewaschen, die vereinigten Filtrate mit Kaliumhydrogencarbonat gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand wiederholt mit Petroläther ausgewaschen. Das zurückbleibende sirupöse Tribenzyl-*n*-butyl-pyrophosphat (3.7 g entspr. 75% d. Th.) wird zusammen mit 2.3 g Natriumjodid in 30 ccm Aceton gelöst und die Lösung 20 Min. rückfließend gekocht, wobei das Dinatriumsalz (VIIIa) des obigen Diesters kristallinisch ausfällt. Ausb. 2 g (73% d. Th.). Zur Reinigung wird es in wenig Wasser gelöst und mit Aceton wieder ausgefällt.

$\text{Na}_2\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{P}_2$ (368.1) Ber. P 16.85 Gef. P 16.75

n-Butyl-pyrophosphorsäure: Die Lösung von 1.5 g des Natriumsalzes VIIIa (4 mMol) in Methanol-Wasser wird nach Zusatz von 4 ccm *n* NaOH in Gegenwart von Palladiumschwarz katalytisch hydriert. Gewöhnlich ist die Hydrierung nach wenigen Minuten beendet (Verbrauch an Wasserstoff ca. 100 ccm bei 27°/754 Torr). Das Filtrat wird mit Essigsäure auf p_{H} 7.5 gebracht und mit einer alkohol. Lösung von 2.4 g Bariumjodid versetzt. Das sich ausscheidende Bariumsalz (entspr. IXa) wird abzentrifugiert, erst mit Wasser und dann wiederholt mit Aceton ausgewaschen. Ausb. 1.5 g (88% d. Th.).

$\text{Ba}_2\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_{14}\text{P}_4$ (874.2) Ber. P 14.2 Ba 47.1 Gef. P 14.3 Ba 46.8

137. Helmut Hörmann, Wolfgang Graßmann, Erich Wünsch und Hartmuth Preller^{*)}: Die Veresterung von Peptiden und ihre Bedeutung für die Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren nach der Reduktionsmethode

[Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Regensburg]

(Eingegangen am 12. Dezember 1955)

Die Reduktion veresterter Carboxylgruppen in Peptiden mit Lithiumborhydrid verläuft in sämtlichen von uns untersuchten Fällen ohne Nebenreaktionen. Dagegen läßt sich die Veresterung selbst, die notwendig ist, um die freien Carboxylgruppen einer quantitativen Reduktion zugänglich zu machen, mit Methanol-Salzsäure oder Methanol-Acetanhydrid nicht vollkommen einwandfrei durchführen. Ein besonders abweichendes Verhalten zeigt das Tripeptid Glycyl-phenylalanyl-serin, das einerseits in beträchtlichem Maße ein gemischtes Diketopiperazin aus Phenylalanin und Serin abspaltet und andererseits, insbesondere bei Behandlung mit Methanol-Acetanhydrid, unter Acylwanderung am Serinrest Umlagerung zum Esterpeptid erfährt. Mit Diazomethan dagegen ließen sich sämtliche Peptide einwandfrei verestern, wenn vorher ihre freien Aminogruppen durch den DNP-Rest substituiert waren.

Ein Weg zur Bestimmung freier Carboxylendgruppen in Peptiden und Proteinen besteht in der Reduktion der endständigen Aminosäuren zu Aminoalkoholen¹⁾, die dann nach Hydrolyse des Eiweißkörpers, am besten als Di-

^{*)} Zum größten Teil Diplomarbeit H. Preller, München 1956.

¹⁾ Cl. Fromageot, M. Jutisz, D. Meyer u. L. Penasse, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 6, 283 [1950].

nitrophenyl-(DNP)-Derivate²⁾, isoliert und identifiziert werden können. Wie eingehende Untersuchungen sowohl von uns^{2,3)} als auch von J. L. Bailey⁴⁾ gezeigt haben, eignet sich zur selektiven Reduktion der Carboxylgruppe, wobei Peptidbindungen nicht angegriffen werden dürfen, nur Lithiumborhydrid. Lithiumaluminiumhydrid und Aluminiumhydrid wirken zu stark und reduzieren auch Peptidbindungen in wechselndem Ausmaß^{4,5)}, während Kalium- und Natriumborhydrid zu schwache Reduktionsmittel sind, um Carboxylgruppen oder ihre Ester anzugreifen⁶⁾. Vielleicht läßt sich auch Calciumborhydrid, das von Kollonitsch und Mitarbeitern⁷⁾ zur Reduktion von Estergruppen vorgeschlagen wurde, für diese Zwecke verwenden.

Freie Carboxylgruppen werden von Lithiumborhydrid im Gegensatz zu Lithiumaluminiumhydrid nur zu einem geringen Bruchteil angegriffen³⁾, während Estergruppierungen vollständig reduziert werden⁸⁾. Für eine quantitative Bestimmung der Carboxylendgruppen ist es daher notwendig, dieselben vor der Reduktion zu verestern.

Bereits in den früheren Veröffentlichungen konnten wir zeigen und finden es auch in der vorliegenden Arbeit immer wieder bestätigt, daß gereinigte Peptidester durch Lithiumborhydrid in siedendem Tetrahydrofuran keine Spaltung von Peptidbindungen erleiden, und daß die Estergruppe in nahezu quantitativer Ausbeute reduziert wird. Dagegen erwies es sich im Hinblick auf einige abweichende Beobachtungen als notwendig zu untersuchen, ob bei der Veresterung Nebenreaktionen auftreten, die zur Bildung von Estergruppen aus Peptidbindungen führen können. Als solche Nebenreaktionen wären neben einer normalen alkoholytischen Aufspaltung von Peptidbindungen auch Acylwanderungen an Hydroxyaminosäuren zu erwarten, die bekanntlich durch Säuren katalysiert werden⁹⁾.

Zur Veresterung von Peptiden und Proteinen wird üblicherweise Methanol-Salzsäure verwendet. Es ist dabei nicht notwendig, die Lösung mit Chlorwasserstoff zu sättigen, wie es von früheren Autoren angegeben wurde¹⁰⁾, sondern es genügt bereits eine 0.1 *n* Konzentration¹¹⁾. Soweit an Hand von van Slyke-Bestimmungen festzustellen war,

²⁾ W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, Chem. Ber. **86**, 1477 [1953].

³⁾ W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, Chem. Ber. **88**, 102 [1955].

⁴⁾ Biochem. J. **60**, 170 [1955].

⁵⁾ R. Nystrom u. W. G. Brown, J. Amer. chem. Soc. **70**, 3738 [1948]; A. Uffer u. E. Schlittler, Helv. chim. Acta **31**, 1397 [1948]; P. Karrer u. B. J. R. Nikolaus, ebenda **35**, 1581 [1952]; V. M. Mićović u. M. L. Mihailović, J. org. Chemistry **18**, 1190 [1953]; M. Jutisz, D. M. Meyer u. L. Penasse, Bull. Soc. chim. France **1954**, 1087.

⁶⁾ S. W. Chaikin u. W. G. Brown, J. Amer. chem. Soc. **71**, 122 [1949]; E. B. Reid u. J. R. Siegel, J. chem. Soc. [London] **1954**, 520; J. K. Hamilton u. F. Smith, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3543 [1954]. Über eine Reduktion von Carbonsäureestern mit NaBH₄ bei Gegenwart von AlCl₃ siehe H. C. Brown u. B. C. S. Rao, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3164 [1955].

⁷⁾ J. O. Kollonitsch, O. Fuchs u. V. Gabor, Nature [London] **175**, 346 [1955].

⁸⁾ R. F. Nystrom, S. W. Chaikin u. W. G. Brown, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3245 [1949]. ⁹⁾ A. P. Phillips u. R. Baltzly, J. Amer. chem. Soc. **69**, 200 [1947].

¹⁰⁾ K. Felix u. H. Rauch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **200**, 27 [1931]; K. Felix u. H. Reindl, ebenda **205**, 11 [1932]; A. Kiesel u. M. Znamenskaja, ebenda **218**, 89 [1932].

¹¹⁾ H. Fraenkel-Conrat u. H. S. Olcott, J. biol. Chemistry **161**, 259 [1945]; s. a. W. F. H. M. Mommaerts u. H. Neurath, ebenda **185**, 909 [1950].

sollen dabei keine Peptidbindungen geöffnet werden¹¹). Neben Chlorwasserstoff wurden als Katalysatoren auch noch Acetylchlorid¹²) oder Acetanhydrid¹³) vorgeschlagen. Bei diesen Verfahren bildet sich wohl zuerst das Säurechlorid oder das gemischte Anhydrid der zu veresternden Carboxylgruppe, welches dann mit dem Alkohol weiter zum Ester reagiert. Gleichzeitig werden auch die freien Aminogruppen acetyliert. Auch mit Diazomethan lassen sich Peptide verestern, wenn man ihre Aminogruppen durch Substituenten, die die Basizität aufheben, blockiert¹⁴). Beachtet man diese Maßnahme nicht, so erhält man infolge der zwitterionischen Natur der Peptide betainartige Reaktionsprodukte^{14, 15}).

Zuerst haben wir die Peptide Glycyl-phenylalanin und Prolyl-glycyl-phenylalanin mit Methanol-0.1*n* HCl und mit Methanol-10 % Acetanhydrid verestert. Dabei konnten wir papierchromatographisch feststellen, daß bei beiden Arbeitsweisen geringe Mengen von Bruchstücken auftraten. Nach Veresterung sowohl des Dipeptides wie des Tripeptides mit Acetanhydrid als Katalysator zeigte das (wegen des Fehlens freier Aminogruppen nach F. Reindl und W. Hoppe¹⁶) angefärbte) Chromatogramm neben dem acetylierten Peptidester und kleinen Mengen von Bruchstücken noch eine bedeutendere Fraktion, welche dieselben Aminosäuren wie das Ausgangsmaterial enthielt. Sie reagierte gleichfalls nicht mit Ninhydrin und gab beim Besprühen mit Umbelliferon (zum Nachweis von Carboxylgruppen) keine Fluoreszenz, wodurch die Möglichkeit ausgeschlossen wird, daß es sich um unverestertes Acetylpeptid handeln könnte. Möglicherweise liegt hier ein Cyclisierungs- oder Dimerisierungsprodukt vor, das sich durch Umsetzung des als Zwischenprodukt anzunehmenden gemischten Anhydrides aus Peptid und Essigsäure gebildet haben könnte.

Infolge all dieser Nebenreaktionen ergaben, anders als bei der Reduktion gereinigter Peptidester^{2, 3}), die nach Veresterung mittels beider Methoden erhaltenen Reaktionsprodukte bei ihrer Reduktion mit Lithiumborhydrid und nachfolgender saurer Hydrolyse auch Spuren von Aminoalkoholen nicht carboxylendständiger Aminosäuren. Ihre Mengen, die nach üblicher Isolierung als DNP-Derivat bestimmt wurden, betrugen zwischen 3 und 7 % (Tafel 1). Dementsprechend war die Ausbeute an Endgruppen erniedrigt, und zwar besonders im Falle der Veresterung mit Methanol und Acetanhydrid, was wir auf die oben erwähnte Dimerisierung oder Cyclisierung zurückführen.

Gegenüber diesen Methoden der Veresterung ergab das Verfahren mit Diazomethan, wobei der DNP-Rest zum Schutz der Aminogruppen verwendet wurde, keine Nebenprodukte. Nach Reduktion mit Lithiumborhydrid in siedendem Tetrahydrofuran und Hydrolyse ließ sich ausschließlich die Carboxylendgruppe als DNP-Aminoalkohol in sehr guter Ausbeute isolieren.

Eine methylierende Spaltung von Amidbindungen, wie sie H. Biltz¹⁷) an acetylierten Spirodihydantoinen und Bredereck und Mitarbb.¹⁸) an N⁷-acetylierten Purinen beob-

¹²) K. Freudenberg u. W. Jakob, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1001 [1941].

¹³) J. N. Ashley u. C. R. Harrington, Biochem. J. 28, 1178 [1929]; s. a. S. Blackburn u. H. Phillips, ebenda 88, 171 [1944].

¹⁴) J. Herzig u. K. Landsteiner, Biochem. Z. 61, 463 [1914]; 105, 11 [1920].

¹⁵) K. Landsteiner, Biochem. Z. 58, 362 [1914]; H. Herzig u. K. Landsteiner, Biochem. Z. 61, 458 [1914]; E. Abderhalden u. H. Sickel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 117, 1 [1927]; R. Kuhn u. H. W. Ruelius, Chem. Ber. 85, 38 [1952].

¹⁶) Chem. Ber. 87, 1103 [1954]. ¹⁷) Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 1146 [1931].]

¹⁸) H. Bredereck, I. Hennig u. W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 86, 321 [1953].

Tafel 1. Ausbeuten an DNP-Aminoalkoholen nach der Reduktion von Peptiden, die nach verschiedenen Methoden verestert worden waren

Peptid	gefundener DNP-Amino- alkohol	Ausbeuten an DNP-Aminoalkoholen in % d. Th.		
		Veresterungsmethode		
		Methanol- 0.1 n HCl	Methanol- 10% Acetan- hydrid	DNP-Peptid Diazomethan
Gly-phe	DNP-Phe-ol	87.1	53.8	84.0
	DNP-Gly-ol	3.5	3.8	—
Pro-gly-phe ..	DNP-Phe-ol	70.6	64.0	84.1
	DNP-Gly-ol	4.1	6.6	—
	DNP-Pro-ol	3–4	3–4	—
Gly-phe-ser ..	DNP-Ser-ol	44.0	39.1	77.3
	DNP-Phe-ol	4.6	14.4	—
	DNP-Gly-ol	24.4	20.6	—
DNP- Gly-phe-ser ..	DNP-Ser-ol		52.0	
	DNP-Phe-ol		13.1	
	DNP-Gly-ol		—	

achtet haben, dürfte nur in besonders gelagerten Fällen eintreten und wurde von uns nicht bemerkt. Beim Arbeiten mit Diazomethan ist zu beachten, daß dieses Reagens im allgemeinen beträchtliche Mengen Methylamin enthält, welches bei ungenügender Abtrennung im späteren Gang der Untersuchung stört, da es ebenfalls mit FDNB unter Bildung von *N*-Methyl-2,4-dinitro-anilin reagiert.

Unsere Versuche bestätigen also erneut, daß bei der Reduktion von Peptidestern mit Lithiumborhydrid in siedendem Tetrahydrofuran die Peptidgruppierung nicht angegriffen wird, denn sonst hätte im Falle der Reduktion von DNP-Prolyl-glycyl-phenylalaninester neben DNP-Phenylalaninol noch DNP-Colamin nachgewiesen werden müssen. Auch die ursprüngliche Aminoendgruppe hätte sich noch als DNP-Aminoalkohol finden können, da die DNP-Gruppierung des DNP-Peptidesters während der Reduktion zumindest noch teilweise erhalten bleibt¹⁹⁾.

Unser Befund, daß Lithiumborhydrid Peptidbindungen intakt läßt, ist neuerdings von J. C. Crawhall und D. F. Elliott²⁰⁾ angegriffen worden, die Benzoylglycyl-alaninester mit Lithiumborhydrid in siedendem Tetrahydrofuran reduziert und nach der Hydrolyse neben Alaninol auch Colamin in geringer Menge nachgewiesen haben. Wir haben diesen Versuch nachgearbeitet und gefunden, daß unter diesen Bedingungen aus reinem Benzoylglycyl-alanin-methylester, unter strengstem Wasserausschluß bei der Reduktion, nur Alaninol und kein Colamin entsteht. Wir haben diese Aminoalkohole in der üblichen Weise als DNP-Verbindungen isoliert und säulenchromatographisch getrennt²¹⁾, während Crawhall und Elliott das gesamte Hydrolysat papierchromatographisch aufgetrennt und mit Ninhydrin entwickelt haben.

Hatten bereits die Veresterungsversuche an einfach gebauten Peptiden einige Nebenreaktionen gezeigt, so ergab die Veresterung eines Serinpep-

¹⁹⁾ K. Heyns u. K. Stange, Z. Naturforsch. 10 b, 252 [1955].

²⁰⁾ Nature [London] 175, 299 [1955]; Biochem. J. 61, 264 [1955].

²¹⁾ W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 296, 208 [1954].

tides, Glycyl-phenylalanyl-serin, ein schwieriger übersehbares Bild. Ein Papierchromatogramm des mit Methanol-0.1 *n* HCl veresterten Produktes ließ beim Besprühen mit Ninhydrin neben dem Peptidester eine bedeutende Menge Glycinester erkennen, dessen Menge zu etwa 16 % des insgesamt im Peptid vorhandenen Glycins ermittelt wurde. Bei der Anfärbung nach Reindl-Hoppe¹⁶⁾ erschien weiterhin eine Komponente, die bei der Hydrolyse Serin und Phenylalanin ergab. Da diese Verbindung mit Ninhydrin kaum angefärbt wurde, handelt es sich offenbar um das entsprechende Diketopiperazin. Auf Grund der Tatsache, daß ein Teil des carboxylendständigen Serins durch diese Cyclisierung blockiert war, fand man auch nach Reduktion mit Lithiumborhydrid und saurer Verseifung des Reaktionsgemisches Serinol nur in stark verminderter Ausbeute (44 %), während das ursprünglich nicht carboxylendständige Glycin zu 23 % als DNP-Colamin erhalten wurde (Tafel 1). In diesem Versuch, der getrennt von dem papierchromatographisch aufgearbeiteten ausgeführt worden war, hatten also 23 % des Peptides eine Spaltung in Glykokollester und das gemischte Diketopiperazin aus Serin und Phenylalanin erlitten. Daneben fand sich noch zu 4.6 % DNP-Phenylalaninol; was von einer geringen Acylwanderung an der Bindung zwischen Phenylalanin und Serin herrühren dürfte (s. u.). Die nicht reduzierten Aminosäuren ließen sich nach Überführung in die DNP-Derivate quantitativ zurückgewinnen. Eine mögliche Zersetzung von endständigem Serin in Glykokoll²²⁾, das nach der Reduktion als DNP-Colamin auftreten würde, kann daher ausgeschlossen werden (vergl. Tafel 2).

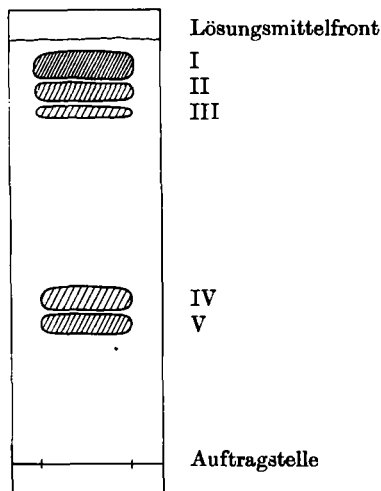
Tafel 2. Reduktion von Glycyl-phenylalanyl-serin mit Lithiumborhydrid nach verschiedenartiger Veresterung

(Verwendet wurden je 32 μ Mol Peptid. Nach Hydrolyse wurden Aminoalkohole und Aminosäuren als DNP-Verbindungen getrennt und chromatographisch quantitativ bestimmt.)

Stamm- amino- säure	DNP-Aminoalkohole		DNP-Aminosäuren		Summe % d. Th.
	μ Mol	% d. Th.	μ Mol	% d. Th.	
Veresterung mit Methanol- 0.1 n HCl					
Gly	7.82	24.4	24.0	75.0	95.4
Phe	1.3	4.6	29.4	91.7	96.3
Ser	14.25	44.0	17.9	55.6	99.6
Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid					
Gly	6.6	20.4	22.0	68.7	89.3
Phe	4.6	14.4	26.0	81.3	95.7
Ser	12.5	39.1	17.0	53.2	92.3
Veresterung des DNP-Peptides mit Diazomethan					
Gly	—	—			
Phe	—	—			
Ser	24.75	77.3			

²²⁾ Th. Wieland, H. Cords u. E. Keck, Chem. Ber. 87, 1312 [1954]; Th. Wieland u. K. Dose, Angew. Chem. 66, 781 [1954].

Noch etwas unübersichtlicher war vorerst das Ergebnis, das wir mit Glycyl-phenylalanyl-serin nach Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid erhielten. Das Chromatogramm, das wir wegen der Blockierung sämtlicher freier Aminogruppen durch den Acetylrest wieder nach der Methode von



Papierchromatogramm von Glycyl-phenylalanyl-serin nach Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid. Lösungsmittel: Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5

Reindl und Hoppe¹⁶⁾ angefärbt hatten, zeigte fünf Flecken an (s. die Abbild.), von denen drei (I–III) sämtliche Aminosäuren des eingesetzten Peptides enthielten. Im Fleck IV ließ sich nach der Hydrolyse nur Phenylalanin und Serin, in Fleck V, dessen R_F -Wert dem von Acetylglycinester entsprach, nur Glycin nachweisen. Nach dem Ausschneiden der Flecken und Hydrolyse ließ sich durch kolorimetrische Bestimmung mit Ninhydrin zeigen, daß der Aminosäuregehalt der beiden Flecken IV und V größenordnungsgemäß im Verhältnis 2:1 war. Auch hier beobachtet man also offenbar eine teilweise Aufspaltung des Serinpeptides in ein Diketopiperazinderivat (Fleck IV) und Acetylglycinester (Fleck V).

Aus der in einem zweiten Versuch nach Reduktion mit Lithiumborhydrid isolierten Menge an DNP-Colamin ging hervor, daß diese Aufspaltung zu etwa

20 % erfolgt war. Die Ausbeute an DNP-Serinol betrug nur 39.6 %. Dagegen war DNP-Phenylalaninol in wesentlich größerer Menge (14.4 %) vorhanden als in dem Ansatz, der mit Methanol-Salzsäure behandelt worden war (4.6 %). Nachdem im Papierchromatogramm von acetylierend verestertem Glycyl-phenylalanyl-serin kein Fleck vorhanden war, der ausschließlich Serin enthielt, und demzufolge eine Abspaltung von endständigem Serin offenbar nicht erfolgt war, muß man annehmen, daß die am Phenylalanin neu entstandene Estergruppierung durch eine teilweise Acylwanderung dieses Restes von der Aminogruppe des Serins zu dessen Hydroxylgruppe gebildet wurde. Wahrscheinlich stellt einer der drei Flecken, die alle drei Aminosäuren des Peptides enthalten, das umgelagerte Esterpeptid dar.



Die Acylwanderung unter dem Einfluß von Acetanhydrid ließ sich an Dinitrophenyl-glycyl-phenylalanyl-serin eindeutig nachweisen. Dazu wurde das mit Acetanhydrid als Katalysator veresterte DNP-Peptid mit $n\text{NH}_3$ behandelt, um die Esterbindungen zu verseifen. In der Lösung ließ sich abgespal-

tenes DNP-Glycyl-phenylalanin papierchromatographisch in einer Ausbeute von 23.1 % neben unverändertem DNP-Glycyl-phenylalanyl-serin nachweisen. Außerdem war freies Serin zu 17.1 % vorhanden. In einem zweiten Ansatz, der durch Reduktion des Peptidesters mit Lithiumborhydrid gearbeitet wurde, konnte DNP-Phenylalaninol in einer Ausbeute von 13.1 % nachgewiesen werden. Die Ausbeute an DNP-Serinol, das der Carboxylendgruppe entstammte, betrug nur 52 %.

Im Zusammenhang mit der schlechten Ausbeute an DNP-Serinol mag erwähnt werden, daß man auch bei Veresterung von Serin und von *N*-Benzoyl-serin mit Methanol-Acetanhydrid nach der Reduktion mit Lithiumborhydrid und Hydrolyse Serinol nur in 10.5- bzw. 15-proz. Ausbeute als DNP-Derivat isolieren kann. Mit Salzsäure als Katalysator lassen sich zwar beide Produkte in guter Ausbeute verestern, doch ergibt nur der benzoylierte Serinester bei der Reduktion einheitliches DNP-Serinol, während Serinesterhydrochlorid selbst ein uneinheitliches Gemenge liefert^{23, 24)}, das den gesuchten DNP-Aminoalkohol nur in einer 9-proz. Ausbeute enthält.

Im Gegensatz zu den Versuchen, in denen Methanol-Salzsäure oder Methanol-Acetanhydrid zur Veresterung verwendet wurden, fand man bei der Einwirkung von Diazomethan auf DNP-Glycyl-phenylalanyl-serin wiederum keine Nebenreaktionen. Die Reduktion des DNP-Esters mit Lithiumborhydrid ergab nach üblicher Aufarbeitung in 77.2-proz. Ausbeute DNP-Serinol als einzigen DNP-Aminoalkohol.

Unsere Ergebnisse bestätigen, daß zwar bei der Reduktion mit Lithiumborhydrid keine Veränderungen der Peptidbindung erfolgen, andererseits aber bei der notwendigen Veresterung, falls sie mit Methanol in Gegenwart von Salzsäure oder Acetanhydrid als Katalysator erfolgt, für das Ergebnis störende Nebenreaktionen eintreten können. Eine einwandfreie Veresterung komplizierter Peptide wird dagegen nach den bisherigen Erfahrungen bei Einwirkung von Diazomethan auf das DNP-Peptid erreicht. Für die Bestimmung der Carboxylendgruppen bietet diese Veresterungsweise weiterhin den Vorteil, daß dabei auch die Aminoendgruppe nach Reduktion und Hydrolyse identifiziert werden kann, da Lithiumborhydrid den DNP-Rest weitgehend intakt läßt¹⁶⁾.

Die Abspaltung der beiden carboxylendständigen Aminosäuren als Diketopiperazinderivate unter sauren Bedingungen stellt eine bis jetzt noch unbekannte Reaktion dar, die sicher eng mit der besonderen Struktur des untersuchten Tripeptides zusammenhängt. An einfachen Peptiden ist eine solche Abspaltung bis jetzt nur beim Erhitzen zusammen mit Basen beobachtet worden²⁴⁾. Wie weit diese Reaktion auch in Proteinen zu erwarten ist, die ja eine wesentlich größere Stabilisierung ihrer Peptidketten durch Wasserstoffbrücken aufweisen, entzieht sich vorläufig noch unserer Kenntnis.

Dagegen ist die Acylwanderung eine bereits gut bekannte Reaktion. Die ersten Arbeiten dazu stammen von Bergmann und Mitarbeitern²⁵⁾ die, nach vorhergehenden Versuchen an einfachen *N*-Acylaminoalkoholen, *N*-Benzoyl-serinester mit Thionyl-

²³⁾ P. Karrer, P. Portmann u. M. Suter, *Helv. chim. Acta* **31**, 1617 [1948].

²⁴⁾ G. Schramm u. I. Leube, *Makromolekulare Chem.* **18**, 117 [1954].

²⁵⁾ M. Bergmann, E. Brand u. F. Dreyer, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **54**, 936 [1921]; M. Bergmann, E. Brand u. F. Weinmann, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **181**, 1 [1923].

chlorid in 2-Phenyl-3-carbomethoxy-oxazolon überführten, welches mit Säure in den *O*-Benzoyl-serinester überging²⁶). Spätere Untersuchungen anderer Autoren haben dann gezeigt, daß eine solche Umlagerung auch durch Säuren allein, wenn auch nicht vollständig, hervorgerufen werden kann⁹), was wohl auch ein Grund für die leichtere Hydrolysierbarkeit von Serinpeptiden sein dürfte²⁷). D. F. Elliott²⁸) hat mit Hilfe von konz. Schwefelsäure an Seidenfibroin eine Acylwanderung der Peptidbindungen der Hydroxyaminosäuren erreicht und konnte nach Schutz der entstandenen freien Aminogruppen durch den DNP-Rest mit anschließender schwach alkalischer Hydrolyse die gebildeten Esterbindungen spezifisch aufspalten. J. L. Bailey²⁹) andererseits, der diese Umlagerung auf die durch Reduktion erhaltenen Peptidalkohole anwendet, hat darauf ein Verfahren zum schrittweisen Abbau von Peptiden am Carboxylende aufgebaut.

Nach unseren Befunden und denjenigen von Fraenkel-Conrat und Olcott¹¹) tritt jedoch mit 0.1 *n* HCl in Alkohol nur eine sehr geringe Acylwanderung an Serinbindungen ein. Dagegen ist diese Reaktion bei Verwendung von Acetanhydrid als Veresterungskatalysator wesentlich stärker begünstigt. Vielleicht dürfte auch die gegenüber dem errechneten Wert etwas zu hohe Ausbeute an DNP-Alanin, die wir bei der Reduktion von acetylierend verestertem Insulin mit Lithiumborhydrid erhalten hatten³), auf eine solche Acylwanderung an der Bindung zwischen Alanin und Serin zurückzuführen sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Unterstützung dieser Arbeit sehr dankbar.

Beschreibung der Versuche

1. Allgemeine Arbeitsmethoden

Veresterung mit Methanol-Salzsäure: Sofern nicht anders angegeben, ließ man 5 mg Peptid mit 5 ccm wasserfreier 0.1 *n* methanol. HCl 24 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wurde die Lösung i. Vak. zur Trockene gedampft, der Rückstand mehrmals mit Methanol aufgenommen und erneut abgedampft. Zur papierchromatographischen Prüfung wurde ein aliquoter Teil der methanolischen Lösung aufgetragen und mit dem Gemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) entwickelt. Die Chromatogramme wurden sowohl mit Ninhydrin als auch durch Chlorieren und anschließendes Baden in einer Benzidin-Kaliumjodidlösung nach Reindl und Hoppe¹⁶) angefärbt.

Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid: 5 mg Peptid wurden mit 5 ccm absol. Methanol und 0.5 ccm Acetanhydrid 20 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei eine klare Lösung entstand. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels i. Vak. hinterblieb ein öliger Rückstand. Die papierchromatographische Untersuchung desselben geschah mit einem aliquoten Teil seiner methanolischen Lösung. Als Lösungsmittel diente Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5). Das Anfärben der Chromatogramme geschah nach der Methode von Reindl und Hoppe¹⁶).

Darstellung der DNP-Peptide und ihre Veresterung mit Diazomethan: 10 mg Peptid wurden in 3 ccm 66-proz. Alkohol mit 100 mg NaHCO₃ und 100 mg DNFB versetzt. Nach 3 Stdn. wurde mit 10 ccm Wasser verdünnt und nicht umgesetztes DNFB ausgeäthert. Nach dem Ansäuern mit 1 ccm konz. Salzsäure ließ sich das DNP-Peptid mit Äther ausschütteln, sofern es nicht bereits ausfiel (DNP-Glycyl-phenylalanyl-serin). Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit 10 ccm Wasser gewaschen und eingedampft. Zur Entfernung von 2,4-Dinitrophenol nach Turba³⁰) wurde der Ätherückstand in 0.5 ccm Methanol aufgenommen, auf eine Säule von anionotropem Al₂O₃ (9×100 mm) aufgebracht und mit 0.5 ccm Methanol nachgewaschen. Mit 2-proz. Essigsäure ging Dinitrophenol in das Eluat, und dann wurde das DNP-Peptid zuerst mit wenig 0.1 *n*

²⁶) M. Bergmann u. A. Miekeley, Hoppe-Scyler's Z. physiol. Chem. **140**, 128 [1924]; Collegium [Darmstadt] **1925**, 225.

²⁷) P. Desnuelle u. A. Casal, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **2**, 64 [1948].

²⁸) Biochem. J. **50**, 542 [1952]. ²⁹) Biochem. J. **52**, iv [1952]; **60**, 173 [1955].

³⁰) F. Turba u. G. Gundlach, Biochem. Z. **326**, 322 [1955].

NaOH und anschließend mit einer 1-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung eluiert. Die erhaltene Lösung wurde angesäuert und mit Äther extrahiert.

Zur Veresterung wurde der Ätherrückstand in 5 ccm Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung gasförmiges Diazomethan eingeleitet, welches nach R. Kuhn und W. H. Ruelius³¹⁾ aus einer Toluollösung bei 45° mit Stickstoff ausgetrieben und bei -18° von Methylamin befreit worden war. Nach 4stdg. Stehenlassen unter Eiskühlung wurde noch 15 Min. unter Rückfluß gekocht, wobei der größte Teil an unverbrauchtem Diazomethan entwich. Das Methanol wurde i. Vak. abgedampft.

Bestimmung der Carboxylendgruppe durch Reduktion: Das als Lösungsmittel verwendete Tetrahydrofuran wurde gereinigt, indem man 500 g 14 Tage über 100 g festem Kaliumhydroxyd stehen ließ. Nach Filtrieren und Destillieren wurde es zuerst über Natrium und dann nochmals über Lithiumaluminiumhydrid destilliert³²⁾. Vor jeder Reduktion ist es unbedingt notwendig, das Tetrahydrofuran erneut über Lithiumaluminiumhydrid zu destillieren, da das trockene Lösungsmittel ziemlich rasch Wasser aus der Luft aufnimmt. Beim Eintragen von Lithiumborhydrid darf kein Aufschäumen erfolgen.

Das zur Reduktion gelangende Peptidestergemisch wurde über Nacht im Exsiccator über Kaliumhydroxyd getrocknet. Dann wurde es mit 5 ccm absol. Tetrahydrofuran und etwa 30 mg Lithiumborhydrid versetzt und 30 Stdn. unter Rückfluß und Feuchtigkeitsschluß am Wasserbad erhitzt. Nach Zersetzen des überschüssigen Lithiumborhydrids mit 5-proz. Essigsäure unter Eiskühlung wurde i. Vak. abgedampft und mit 2 *n* HCl 8 Stdn. hydrolysiert. Nach dem Abdampfen der Säure i. Vak. blieb der Rückstand über Nacht über Kaliumhydroxyd stehen. Anschließend führte man die Hydrolysenprodukte durch 3stdg. Stehenlassen mit 15 mg DNFB und 100 mg NaHCO₃ in 15 ccm 66-proz. Alkohol in die DNP-Derivate über und gab dann zur Zersetzung von überschüss. DNFB 7 mg Glutaminsäure zu. Nach weiterem 2stdg. Stehenlassen wurde der Alkohol i. Vak. abgedampft, der Rückstand in 10 ccm Wasser aufgenommen und die DNP-Aminoalkohole mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt. Von der erhaltenen Ätherlösung wurde ein aliquoter Teil zur papierchromatographischen Untersuchung im Lösungsmittel Dekalin-10proz. Essigsäure-Isoamylalkohol (15:10:4)³⁾ abgezweigt. Zur Chromatographie diente eine vor Licht geschützte waagrechte Kammer³³⁾, wobei man wesentlich besser abgegrenzte Flecken als nach auf- oder absteigendem Verfahren erhält.

Die quantitative Bestimmung der DNP-Aminoalkohole geschah an einer Kieselgur-Celite-Säule nach der bereits früher gegebenen Vorschrift^{24, 3)}.

Die nach dem Ausschütteln mit Äther in der hydrogencarbonatalkalischen Lösung verbliebenen DNP-Aminosäuren wurden nach dem Ansäuern ausgeäthert und papierchromatographisch mit dem Lösungsmittel Toluol-Pyridin-Glykolchlorhydrin-0.8 *n* Ammoniak (5:1:3:3)³⁴⁾ aufgetrennt. Im Falle des Vorliegens von DNP-Alanin, welches in diesem Lösungsmittel denselben *R_F*-Wert wie das als Nebenprodukt auftretende 2,4-Dinitrophenol aufweist, verwendeten wir als Entwicklungsgemisch Pyridin-Isoamylalkohol-1.6 *n* Ammoniak (6:14:20)³⁴⁾.

Quantitative Bestimmung von DNP-Aminosäuren am Papierchromatogramm: Die quantitative Bestimmung wurde in Anlehnung an das bei Aminosäuren bewährte Verfahren^{35, 36)} ausgeführt. Die zu messenden DNP-Aminosäuren wurden in einem bekannten Volumen Essigester gelöst und ein aliquoter Teil davon, der von jeder

³¹⁾ Chem. Ber. 83, 420 [1950].

³²⁾ F. Weygand, G. Eberhardt, H. Linden, F. Schäfer u. I. Eigen, Angew. Chem. 65, 525 [1953].

³³⁾ W. Graßmann u. R. Strobel, unveröffentlicht, s. a. E. Kawerau, Biochem. J. 47, xxiii [1950]; L. S. Cuendet, R. Montgomery u. F. Smith, J. Amer. chem. Soc. 75, 2764 [1953]; J. Léonis, Ann. Soc. roy. Sci. med. natur. Bruxelles 8, 147 [1955].

³⁴⁾ G. Biserte u. R. Osteux, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 50 [1951].

³⁵⁾ F. G. Fischer u. H. Dörfel, Biochem. Z. 324, 544 [1953].

³⁶⁾ W. Graßmann, K. Hannig u. M. Plöckl, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299, 258 [1955].

DNP-Aminosäure 0.1–0.4 μ Mol enthalten soll, als 3 cm langer Strich aufgetragen. Eine Testlösung ähnlicher Zusammensetzung wurde auf denselben Papierstreifen daneben in 2–3 cm Abstand aufgebracht. Beide Proben sollen vom Papierrand noch 1.5 cm entfernt sein. Die Chromatogramme wurden in einer waagrechten Kammer³⁷⁾ entwickelt. Die verwendeten Lösungsmittel sind jeweils bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die Chromatogramme wurden im Dunkeln an der Luft getrocknet und in Streifen von 4 cm Breite geschnitten. Dann wurden sie durch $\frac{1}{2}$ stdg. Einlegen in ein Gemisch von α -Bromnaphthalin und Paraffinöl mit dem Brechungsindex 1.5 durchsichtig gemacht. In diesem Gemisch sind die DNP-Aminosäuren und Dinitrophenol unlöslich, DNP-Aminoalkohole hingegen gehen in Lösung, weshalb dieselben auf diese Art nicht bestimmt werden können. Die durchsichtigen Streifen wurden im Kolorimeter „Eppendorf“ unter Verwendung eines Zusatzgerätes bei 366 m μ millimeterweise ausgemessen und die erhaltenen Extinktionskurven planimetrisch ausgewertet. Aus dem Verhältnis der erhaltenen Werte zu denen der Testlösung ließ sich die Menge der einzelnen DNP-Aminosäuren ermitteln. Das Verfahren eignet sich hauptsächlich zur Bestimmung von Gemischen, die nur eine geringe Anzahl verschiedener DNP-Aminosäuren enthalten.

2. Untersuchungen an serinfreien Peptiden

Glycyl-phenylalanin: Das Peptid, welches nach der Vorschrift von St. Goldschmidt und H. Lautenschlager³⁷⁾ dargestellt worden war, war nach papierchromatographischer Untersuchung im Gemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) einheitlich. Nach Veresterung von 5 mg (22.5 μ Mol) mit Methanol-Salzsäure ergab die papierchromatographische Untersuchung neben der Hauptmenge des Peptidesters (R_F 0.69) geringe Mengen von Glycinester und Phenylalaninester, die durch Mitlaufenclassen entsprechender Vergleichsproben identifiziert wurden. Allem Anschein nach war auch noch eine geringe Menge nicht veresterten Peptides vorhanden, welches einen sehr ähnlichen R_F -Wert (0.64) wie der Ester hat. Nach der Reduktion und Hydrolyse ließ sich papierchromatographisch DNP-Phenylalaninol und eine geringe Menge DNP-Colamin nachweisen. Die säulenchromatographische Trennung ergab 15.11 μ Mol DNP-Phenylalaninol (67.1% d. Th.) und 0.83 μ Mol DNP-Colamin (3.5% d. Th.) neben geringen Mengen Dinitrophenol. In der wäßr. Mutterlauge fand sich DNP-Glycin neben geringen Mengen DNP-Phenylalanin, welches von geringen Anteilen nicht veresterten Peptides herrühren dürfte. Etwas DNP-Glutaminsäure stammte von der Entfernung von überschüss. DNFB.

Das mit Methanol-Acetanhydrid veresterte Dipeptid (5 mg, 22.5 μ Mol) zeigte am Papierchromatogramm nach Reindl und Hoppe¹⁶⁾ zwei deutliche Flecken (R_F 0.75 und 0.89). Sie wurden aus einem getrennten Chromatogramm ausgeschnitten, mit Methanol eluiert und nach dem Verdampfen desselben mit konz. Salzsäure 16 Stdn. hydrolysiert. Die Papierchromatogramme beider Hydrolysate enthielten Glycin und Phenylalanin in ungefähr gleicher Menge. Die Reduktion des acetylierten Peptidesters ergab 12.4 μ Mol DNP-Phenylalaninol (53.8% d. Th.) und 0.87 μ Mol DNP-Colamin (3.8% d. Th.) neben etwas Dinitrophenol. Die wäßr. Mutterlauge enthielt DNP-Glycin, eine Spur DNP-Phenylalanin, Dinitrophenol und DNP-Glutaminsäure, stammend von der Entfernung von überschüss. DNFB.

Nach Veresterung des DNP-Dipeptides (45 μ Mol) mit Diazomethan ergab die Reduktion 37.8 μ Mol DNP-Phenylalaninol (84.0% d. Th.) und Dinitrophenol. In der wäßrigen Mutterlauge fand sich neben Dinitrophenol und DNP-Glutaminsäure nur noch DNP-Glycin.

L-Prolyl-glycyl-L-phenylalanin: Die Darstellung dieses Peptides wird an anderer Stelle beschrieben³⁸⁾. Seine Reinheit wurde im System Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) überprüft.

Das Papierchromatogramm des mit Methanol-Salzsäure veresterten Tripeptids (5 mg, 15.6 μ Mol) ergab neben Peptidester geringe Mengen Prolinester und Phenylalaninester. Nach der Reduktion des Peptidesters ließen sich 11.02 μ Mol DNP-Phenylalaninol

³⁷⁾ Liebigs Ann. Chem. 580, 68 [1953].

³⁸⁾ W. Graßmann u. E. Wünsch, in Vorbereitung.

(70.6 % d. Th.), 0.64 μ Mol DNP-Colamin (4.1 % d. Th.) und etwas DNP-Prolinol nachweisen. DNP-Prolinol konnte nicht exakt quantitativ bestimmt werden, da noch keine kristallisierte Vergleichssubstanz vorlag, somit also der genaue Extinktionskoeffizient fehlte. Als DNP-Aminosäuren wurden in der wäßr. Mutterlauge DNP-Glycin, DNP-Prolin und geringe Mengen DNP-Phenylalanin nachgewiesen. Letzteres dürfte von einer unvollständigen Veresterung herrühren. Außerdem war noch Dinitrophenol und Glutaminsäure, von der Entfernung von überschüssigem DNFB, vorhanden.

Wurde zur Veresterung derselben Menge Tripeptids Methanol-Acetanhydrid verwendet, so enthielt das Papierchromatogramm zwei deutliche (R_F 0.81 und 0.87) und einen schwächeren Fleck (R_F 0.65). Nach der Reduktion ließen sich DNP-Phenylalaninol und DNP-Colamin in Ausbeuten von 9.98 μ Mol (64.0 % d. Th.) und 1.04 μ Mol (6.6 % d. Th.) nachweisen. Geringe Mengen DNP-Prolinol konnten aus den oben erwähnten Gründen nicht quantitativ erfaßt werden. Die wäßrige Mutterlauge enthielt DNP-Prolin, DNP-Glycin und geringe Mengen DNP-Phenylalanin. Daneben waren noch wie üblich Dinitrophenol und DNP-Glutaminsäure vorhanden.

Das mit Diazomethan veresterte DNP-Peptid³⁹⁾ (22.1 μ Mol) lieferte bei der Reduktion an DNP-Aminoalkoholen nur 18.6 μ Mol DNP-Phenylalaninol (84.1 %). Als DNP-Aminosäuren waren in der Mutterlauge nur DNP-Prolin, DNP-Glycin und, von der Zerlegung von überschüssigem DNFB herrührend, DNP-Glutaminsäure, aber kein DNP-Phenylalanin, vorhanden.

Benzoyl-glycyl-DL-alanin-äthylester: Der benzoyleierte Dipeptidester wurde analog einer Vorschrift von E. Fischer⁴⁰⁾ für Benzoyl-glycyl-glycin-äthylester aus Hippurylchlorid und DL-Alanin-äthylester dargestellt. Das mehrmals aus heißem Wasser umkristallisierte Produkt hatte den von T. Curtius und E. Lambotte⁴¹⁾ gefundenen Schmp. von 126°. Es wanderte im Lösungsmittelgemisch Butanol-Dibutyl-äther-Wasser (4:2:5) als einheitliche Substanz, wie die Anfärbung nach Reindl und Hoppe⁴²⁾ ergab. 14 mg Ester (50 μ Mol) wurden wie üblich reduziert. In der isolierten DNP-Aminoalkoholfraktion ließ sich papierchromatographisch nur DNP-Alaninol und etwas Dinitrophenol nachweisen (Lösungsmittel: Dekalin-10proz. Essigsäure-Isoamylalkohol 15:10:4). Die säulenchromatographisch bestimmte Ausbeute an DNP-Alaninol betrug 40.1 μ Mol (80.2 % d. Th.). In der wäßr. Mutterlauge fand sich kein DNP-Alanin mehr.

3. Untersuchungen an Glycyl-DL-phenylalanyl-DL-serin

Darstellung des Peptides

Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanyl-DL-serin: 3.56 g Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanin³⁷⁾ und 2.38 cm Tri-*n*-butylamin wurden in 25 cm Tetrahydrofuran mit 0.96 cm Chlorkohlensäure-äthylester bei -10° umgesetzt. Nach 5 Min. fügte man eine Lösung von 1.56 g DL-Serin-methylester-hydrochlorid und 2.38 cm Tri-*n*-butylamin in 25 cm Chloroform zu, erhitze das Gemisch rasch bis zum beginnenden Sieden und kühle sofort wieder ab. Nach Zugabe von Kaliumhydrogencarbonatlösung und Äther wurden die Schichten getrennt. Die Äther-Chloroformphase wurde i. Vak. zur Trockene gedampft. Aus Essigester-Petroläther schied sich der Carbobenzoxy-tripeptidester als farblose Kristallmasse ab. 3.25 g des erhaltenen Carbobenzoxyesters (Rohprodukt) wurden in wäßrigem Dioxan mit 7.2 cm *n* NaOH verseift, wobei die Zugabe von NaOH tropfenweise unter Rühren erfolgte und mit Thymolphthalein als Indikator kontrolliert wurde. Nach Ansäuern und Entfernen des Dioxans i. Vak. wurde das ausgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen, mit Hydrogencarbonatlösung gewaschen und wieder auf ein kleines Volumen eingeeengt. Auf Zugabe von Petroläther farblose Kristallmasse. Ausb. 2.8 g (88 % d. Th., bez. auf den Carbobenzoxylester). Das Carbo-

³⁹⁾ Das DNP-Tripeptid stellte uns freundlicherweise Herr Dr. G. Deffner zur Verfügung.

⁴⁰⁾ Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine; Berlin, Springer-Verlag 1906, S. 431. ⁴¹⁾ J. prakt. Chem. [2] 70, 116 [1904].

benzoxy-tripeptid ließ sich durch fraktionierte Kristallisation in zwei Diastereoisomere aufspalten:

Fraktion A: farblose Kristalle aus Essigester. Schmp. 150–152°.

($_{22}$ H₂₅O₇N₃ (443.4) Ber. C 59.58 H 5.68 N 9.48 Gef. C 59.62 H 5.77 N 9.30

Fraktion B: aus der Mutterlauge von A. Farblose Kristalle aus Essigester-Petroläther. Schmp. 70–80°.

Glycyl-DL-phenylalanyl-DL-serin: Je 0.44 g Carbobenzoxy-tripeptid (A bzw. B) wurden unter den üblichen Hydrierbedingungen in die freien Peptide übergeführt. Farblose Nadelchen aus Wasser-Alkohol.

Fraktion A: 0.27 g (89% d. Th.).

C₁₄H₁₈O₅N₃ (309.3) Ber. C 54.36 H 6.19 N 13.59 Gef. C 53.99 H 5.97 N 13.46

Fraktion B: 0.28 g (88% d. Th.).

C₁₄H₁₈O₅N₃ + 1/2 H₂O (318.3) Ber. C 52.82 H 6.33 N 13.20

Gef. C 52.54 H 6.18 N 13.12

Zur Untersuchung wurde das Diastereoisomere A herangezogen. Die Einheitlichkeit des Peptides wurde papierchromatographisch im System Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, R_F 0.43) und papierelektrophoretisch bei p_H 4.8 ($m/_{10}$ Phosphatpuffer, 200 V, 18 mA)⁴²⁾ überprüft. Um auch ninhydrin-negative Komponenten erkennen zu können, wurde das Verfahren von Reindl und Hoppe¹⁶⁾ zum Anfärben verwendet. Es war keine Nebenkomponeute erkennbar. Außerdem wurde die Aminoendgruppe mit Hilfe der DNP-Methode⁴³⁾ bestimmt und nur Glycin gefunden.

Veresterung mit Methanol-Salzsäure: 10 mg Peptid (32.2 μ Mol) wurden mit 10 ccm absol. methanolischer Salzsäure, wie oben angegeben, verestert. Die papierchromatographische Aufarbeitung im Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) ergab als Hauptkomponente den Peptidester. Daneben fanden sich aber noch bedeutende Mengen Glykokollester sowie geringe Mengen Serinester und unverestertes Peptid, welche durch Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen identifiziert wurden. Bei der Anfärbung nach Reindl und Hoppe¹⁶⁾ erschien noch ein weiterer Fleck, R_F 0.64, der im ninhydrin-besprühten Chromatogramm nur schwach zu erkennen war. Er wurde aus einem getrennten Chromatogramm ausgeschnitten und mit Methanol eluiert. Nach Hydrolyse mit Salzsäure ließen sich papierchromatographisch im System Pyridin-Wasser (2:1) nur Serin und Phenylalanin in etwa gleicher Menge nachweisen. Es handelte sich also offenbar um das gemischte Diketopiperazin aus Phenylalanin und Serin. In einem getrennten Ansatz wurde die Menge Glycinester papierchromatographisch nach der Methode von Graßmann, Hannig und Plöckl³⁶⁾ quantitativ bestimmt. Seine aus dem 50. Teil des Ansatzes ermittelte Menge betrug 11.5 μ Mol (16.8% d. Th.). Die verhältnismäßig grobe Übereinstimmung dieses Wertes mit dem von DNP-Colamin, welcher nach der Reduktion erhalten wurde (24.4%), dürfte sich vor allem daraus ergeben, daß es sich in beiden Fällen um getrennte Ansätze handelte.

Veresterung mit Methanol-Acetanhydrid: 10 mg Peptid (32.2 μ Mol) wurden mit 10 ccm absol. Methanol und 1 ccm Acetanhydrid wie üblich verestert. Das Reaktionsprodukt lieferte papierchromatographisch im Lösungsmittel Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5) 5 Fraktionen (I R_F 0.94, II R_F 0.88, III R_F 0.83, IV R_F 0.39, V R_F 0.33), welche nach der Methode von Reindl und Hoppe¹⁶⁾ anfärbbar waren. Alle Fraktionen wurden ausgeschnitten und mit Methanol eluiert und nach dem Eindampfen hydrolysiert. Papierchromatographisch (Pyridin-Wasser 2:1) ergaben I und II, die den Hauptanteil ausmachten, sowie III, das in geringerer Menge vorhanden war, alle drei Aminosäuren. IV enthielt nur Serin und Phenylalanin, und zwar in etwa gleichen Mengen, V nur Glycin. Äquivalente Mengen des Hydrolysates von IV und V wurden in Lösung mit Ninhydrin nach S. Moore und W. H. Stein⁴⁴⁾ behandelt und das Extinktionsverhältnis beider Lösungen bestimmt. Es betrug 0.542:0.185.

⁴²⁾ W. Graßmann u. K. Hannig, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 32 [1953].

⁴³⁾ F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 [1945]. ⁴⁴⁾ J. biol. Chemistry 178, 53 [1949].

Reduktion der Veresterungsprodukte: Die Reduktion des nach beiden Methoden veresterten Serinpeptides lieferte die in Tafel 2 wiedergegebenen Ergebnisse. Es wurden auch die Anteile an nicht reduzierten Aminosäuren, die nach dem Ausschütteln der DNP-Aminoalkohole in Form von DNP-Aminosäuren in der wäßrigen Lösung zurückblieben, quantitativ bestimmt.

Veresterung von DNP-Glycyl-DL-phenylalanyl-DL-serin mit Methanol-Acetanhydrid: 10 mg DNP-Tripeptid ($21.5 \mu\text{Mol}$) wurden mit 10 ccm Methanol und 1 ccm Acetanhydrid 20 Stdn. stengelassen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Reaktionsprodukt wie üblich mit Lithiumborhydrid reduziert und aufgearbeitet. Die papierchromatographische Auftrennung der erhaltenen DNP-Aminoalkohole ergab DNP-Serinol und DNP-Phenylalaninol neben Dinitrophenol. Die quantitative Bestimmung derselben ergab $10.97 \mu\text{Mol}$ DNP-Serinol (52.0% d. Th.) und $2.76 \mu\text{Mol}$ DNP-Phenylalaninol (13.1% d. Th.). In der wäßrigen Mutterlauge fanden sich noch DNP-Glycin, DNP-Phenylalanin und etwas DNP-Serin neben Dinitrophenol und DNP-Glutaminsäure, welche bei der Entfernung von überschüss. DNFB entstanden war.

Um eine Acylwanderung an der Bindung zwischen Phenylalanin und Serin nachzuweisen, wurden 5 mg Tripeptid ($16.2 \mu\text{Mol}$) in das DNP-Derivat übergeführt und anschließend acetylierend verestert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand in 10 ccm wäßr. $n \text{ NH}_3$ 10 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach dem Verdampfen i. Vak. wurde der Rückstand in 10 ccm Wasser aufgenommen, angesäuert und ausgeäthert. Die papierchromatographische Prüfung (Butanol-Alkohol-Wasser-konz. Ammoniak 4:4:1:1) des Ätherrückstandes unter Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen zeigte DNP-Glycyl-phenylalanyl-serin und DNP-Glycyl-phenylalanin, welches durch Verseifung der Esterbindung im umgelagerten Peptid entstanden war, neben Dinitrophenol an. In der salzsauren wäßr. Lösung, die noch 6 Stdn. gekocht wurde, ließ sich papierchromatographisch (Pyridin-Wasser 2:1) Serin nachweisen. Eine quantitative papierchromatographische Bestimmung ergab $3.6 \mu\text{Mol}$ DNP-Glycyl-phenylalanin (23.1% d. Th.) und $2.8 \mu\text{Mol}$ Serin (17.2% d. Th.).

Veresterung von DNP-Glycyl-DL-phenylalanyl-DL-serin mit Diazomethan: 14.9 mg DNP-Glycyl-phenylalanyl-serin ($32 \mu\text{Mol}$) wurden, wie oben ausgeführt, mit Diazomethan verestert. Nach der Reduktion mit Lithiumborhydrid fand sich im Ätherauszug der hydrogencarbonatalkalischen Lösung nur DNP-Serinol ($24.75 \mu\text{Mol}$) (77.3% d. Th.) neben Dinitrophenol. In der wäßrigen Mutterlauge fand sich nur DNP-Glycin und DNP-Phenylalanin neben Dinitrophenol und DNP-Glutaminsäure, herrührend von der Entfernung von überschüss. DNFB.