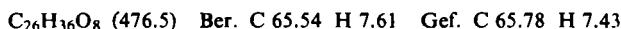
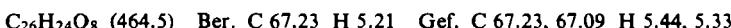


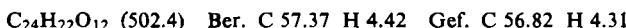
f) *Hydrierung des Adduktes:* 1.4 g *II* verbrauchten in Eisessig in Gegenwart von 5-proz. Palladium auf Bariumsulfat 2 Mol Wasserstoff je Mol des Adduktes. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Entfernung des Eisessigs i. Vak. nahm man die zurückgebliebene bräunliche ölige Masse in Benzol auf und behandelte sie mehrmals mit Aktivkohle. Nach Zusatz von wenig Heptan schied sich das hydrierte Addukt *III* nach längerem Aufbewahren kristallinisch aus. Schmp. 144–145° (mehrmals aus Benzol/Heptan).



g) *Dehydrierung des Adduktes:* 1.5 g *II* wurden mit 1.2 g 20-proz. Palladium auf Aktivkohle innig verrieben und auf 220–230° so lange erhitzt, bis sich kein Wasserstoff mehr entwickelte (16 Stdn.). Die Menge des Gases entsprach etwa den 4 Molen Wasserstoff, die theoret. aus jedem Mol Addukt entstehen. Nach Extraktion mit Aceton schieden sich auf Zusatz von Petroläther und Kühlung die Kristalle des *Biphenyl-Derivates IV* aus. Sie wurden in Aceton gelöst, mehrmals mit Aktivkohle behandelt und wiederholt aus Aceton/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 193–194°.



h) *Biphenyl-hexacarbonsäure-(2.3.4.2'.3'.4')-hexamethylester:* 0.5 g *IV* wurden mit 5 ccm konz. Salpetersäure im Bombenrohr 4 Stdn. auf 150° erhitzt. Aus der anschließend auf 2 ccm konzentrierten Lösung schied sich nach langem Aufbewahren die *Biphenyl-hexacarbonsäure-(2.3.4.2'.3'.4')* (*V*) ab. Da die Reinigung durch Umkristallisieren aus Wasser schwierig ist, wurde mit *Diazomethan* der Methylester hergestellt und mehrmals aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 167.5–169°.



HANS PAUL KAUFMANN und ADELHEID TOBSCHIRBEL

## Über ein Oligopeptid aus Leinsamen

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Münster  
(Eingegangen am 27. Mai 1959)

Als Bestandteil des bei der Herstellung von Leinöl anfallenden Schleimes wurde ein gut kristallisierter Peptidmethylester, der Prolin, Phenylalanin, Leucin und Valin enthält, gefunden.

Aus rohen Pflanzenölen setzen sich Schleime ab, die im Handelsgebrauch als „foots“ bezeichnet werden. Sie bestehen aus Phosphatiden, Wachsen, Eiweißstoffen, Kohlenhydraten und Harzen. Die Zusammensetzung der aus den Schalen der Saaten stammenden Wachse kann mit Hilfe neuer Analysenmethoden ermittelt werden<sup>1)</sup>,

<sup>1)</sup> H. P. KAUFMANN und J. POLLERBERG, Fette Seifen einschl. Anstrichmittel **59**, 815 [1957]; H. P. KAUFMANN und G. KESSEN, noch unveröffentlichte Versuche.

über die Eiweißstoffe ist wenig bekannt. Wir hatten Gelegenheit, ein aus Leinsaat stammendes Oligopeptid näher zu untersuchen<sup>2)</sup>. Es setzt sich in kleinen Mengen beim Verdunsten des Lösungsmittels im Extraktor ab, ist aber auch Bestandteil der Rückstände von Bleicherden bzw. Filterhilfen, die bei der Entschleimung des Rohöles ansfallen. Sie enthielten außerdem Phosphatide, Wachse, Tocopherol, Chlorophyll und Carotin. Bei der Extraktion dieser Filterrückstände mit Aceton und nach wiederholter Umkristallisation bei Gegenwart von A-Kohle wurde ein gut kristallisierender Stoff vom Schmp. 224° gefunden, löslich in Eisessig, Chloroform und den niederen Alkoholen, schwerer in Benzol, nahezu unlöslich in Wasser, Äther und Benzin. Analyse und Molekulargewichtsbestimmung ergaben die empirische Zusammensetzung von C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, die spezif. Drehung betrug 136.5 – 137°. Nachdem die Biuret-Reaktion und der hohe Stickstoffgehalt auf Eiweiß hinwiesen, wurde die schwierig verlaufende Hydrolyse durch Erhitzen am Rückflußkühler mit einem Gemisch von Eisessig und konz. Salzsäure vorgenommen. Der nach Abdampfen und wiederholtem Aufnehmen in Wasser von Salzsäure befreite Rückstand wurde mit 0.1 n NaOH neutralisiert und die erhaltene Lösung der pc-Analyse im System n-Butanol/Eisessig/Wasser unterworfen. Die mit Ninhydrin sichtbar gemachten Flecke zeigten die Gegenwart von Prolin bzw. Hydroxyprolin, Valin, Phenylalanin und Leucin bzw. Isoleucin an. Im System Pyridin/Eisessig/Wasser, das zwar Valin, Phenylalanin und Leucin nicht trennt, wohl aber Prolin und Hydroxyprolin, wurde Prolin identifiziert. Zur Unterscheidung von Leucin und Isoleucin wurde in absteigender Arbeitsweise sowohl im System Methyläthylketon/Pyridin/Wasser als auch im System Pyridin/Amylalkohol/Wasser Leucin erkannt. Eine Bestätigung der gefundenen Zusammensetzung ergab bei geeigneter Abwandlung die pc-Analyse nach R. A. BOISSONNAS<sup>3)</sup>, desgleichen die präparative Aufarbeitung durch fraktionierte Destillation der Äthylester. Die photometrisch und planimetrisch nach F. G. FISCHER und H. DÖRFEL<sup>4)</sup> durchgeführte quantitative pc-Analyse ergab das Verhältnis Leucin: Valin: Phenylalanin: Prolin = 8.4:8.1:7.9:8.9. Es ist demnach je 1 Mol. der Säuren in dem Peptid vorhanden.

Um die Art und Reihenfolge der Verknüpfung der Aminosäuren festzustellen, wurden *Endgruppen-Bestimmungen* durchgeführt:

1. Durch Reduktion des Peptids mit Hilfe von Lithiumborhydrid<sup>5)</sup> wurde die C-terminale Endaminosäure in den entsprechenden Aminoalkohol übergeführt. Nach Hydrolyse und Umsetzung der Spaltprodukte mit Dinitrofluorbenzol konnte der aus der endständigen Aminosäure entstehende DNP-Aminoalkohol auf Grund seiner Wasserlöslichkeit von den DNP-Aminosäuren getrennt werden. Sein Schmp. zeigte, daß Valin C-endständig ist.

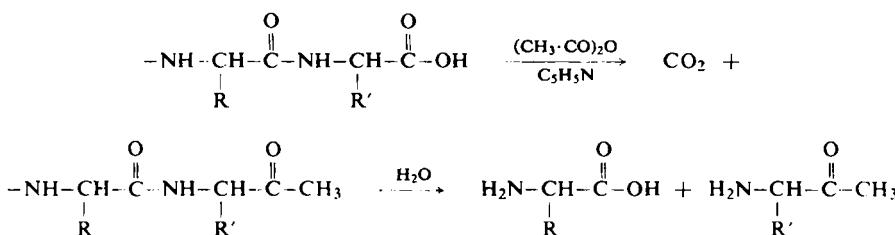
<sup>2)</sup> Gelegentlich einer Besichtigung der Minnesota Linseed Oil Co., Minneapolis, wurde der eine von uns auf diesen bisher nicht beobachteten Stoff aufmerksam gemacht, dessen Konstitution unbekannt war. Für die Überlassung einer Probe sei auch an dieser Stelle gedankt.

<sup>3)</sup> Helv. chim. Acta 33, 1970 [1950].

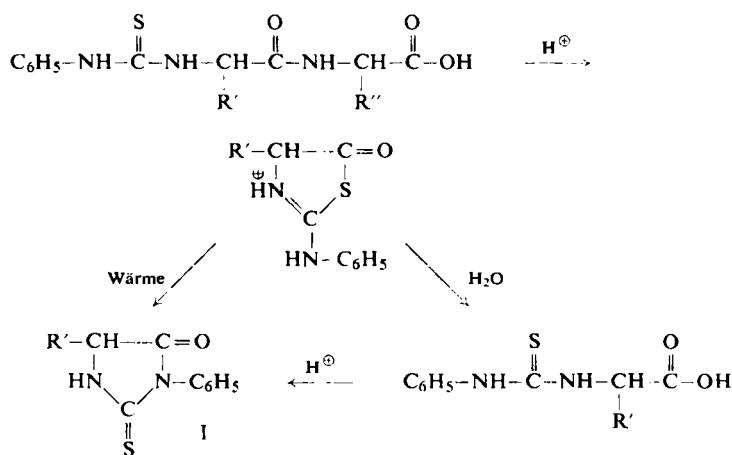
<sup>4)</sup> Biochem. Z. 324, 544 [1935].

<sup>5)</sup> W. GRASSMANN, W. HÖRMANN und H. ENDRES, Chem. Ber. 86, 1477 [1953]; H. JATZKEWITZ und NGUYEN-DANG TAM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 296, 188 [1954].

2. Nach R. A. TURNER<sup>6)</sup> wurde das Peptid mit Acetanhydrid in Pyridin umgesetzt. Wie aus dem folgenden Reaktionsablauf zu erkennen ist, darf das Hydrolysenprodukt die C-terminale Aminosäure nicht enthalten, was durch die pc-Analyse bestätigt wurde.



3. Die Identifizierung der N-terminalen Aminosäure gelang durch Umsetzung des Peptids mit Phenylisothiocyanat zum 3-Phenyl-2-thio-hydantoin<sup>7)</sup> I; Die Bildung des



letzteren bewies das bei 270 m $\mu$  liegende Maximum im UV-Spektrum; andererseits zeigten die für das Phenylthiohydantoin des Proline charakteristischen Banden des IR-Spektrums, daß Prolin die *N*-terminale Aminosäure ist.

4. Durch Umsetzung des Peptids mit Dinitrofluorbenzol<sup>8)</sup> konnte die entsprechende DNP-Verbindung dargestellt werden. Es gelang jedoch nicht, das DNP-Derivat der N-terminalen Aminosäure zu isolieren, da das DNP-Prolin gegen Hydrolyse nicht beständig ist.

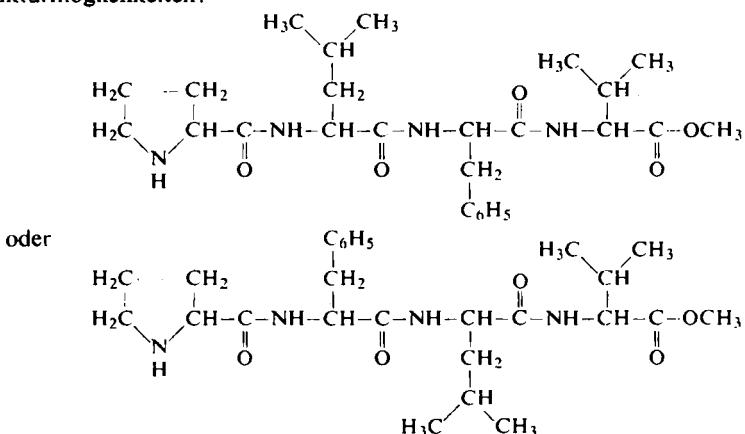
Die Löslichkeit, die Elementaranalyse und das Fehlen einer freien Carbonylgruppe ließen vermuten, daß das neue Peptid als Methylester vorliegt. Den Beweis erbrachte die nach A. P. MATHERS und M.J.PRO<sup>9)</sup> durchgeführte Methoxylgruppen-Bestimmung.

<sup>6)</sup> J. Amer. chem. Soc. **71**, 841 [1949]; **76**, 949 [1954].

<sup>7)</sup> H. FRAENKEL und J. I. HARRIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 6058 [1954].

8) F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 [1945]. 9) Analytic. Chem. 27, 1662 [1955].

Die vorstehenden Versuche zeigen somit, daß das Prolin die *N*-terminale, das Valin die *C*-endständige Aminosäure ist. Daher bleiben für das Leinsaat-Peptid folgende Strukturmöglichkeiten:



## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Das rein weiße krist. Peptid vom Schmp. 224° wurde durch mehrstündige Extraktion mit Aceton aus Preßrückständen und nachfolgendes mehrmaliges Umkristallisieren aus dem gleichen Lösungsmittel isoliert.

Elementaranalyse: C 63.25; H 8.37; N 11.31

Mol.-Gew. (kryoskop. nach BECKMANN): 483, 479, 470

Zur hydrolytischen Spaltung wurden 0.5 g der Verbindung in 4 ccm Eisessig gelöst, 15 ccm konz. Salzsäure zugegeben und 5–6 Stdn. unter Rückfluß gekocht oder, in einem Reagenzglas zugeschmolzen, ca. 10 Stdn. im Trockenschrank bei 110° aufbewahrt. Nach Abdestillieren des Eisessigs und der Salzsäure i. Vak. nahm man die Hydrochloride der Aminosäuren in Wasser auf, neutralisierte mit 0.1 n NaOH und untersuchte anschließend papierchromatographisch auf Whatman-1-Papier absteigend im System Butanol/Eisessig/Wasser (40:10:10 Volumenteile). *Prolin*, *Valin*, *Leucin* und *Phenylalanin* wurden mit Hilfe von reinen Vergleichssubstanzen identifiziert.

Zur Darstellung der Äthylester brachte man das erhaltene gelbe Hydrolysat auf dem Wasserbad zur Trockne, zerkleinerte im Mörser und beseitigte anhaftendes Wasser durch Erhitzen an der Vakuumpumpe. Anschließend veresterte man unter Einleiten eines kräftigen, trockenen Chlorwasserstoff-Stromes mit absol. Äthanol. Die Aminosäureester-hydrochloride wurden mit etwas Wasser übergossen, mit Äther überschichtet und unter gleichzeitiger Kühlung mit wenigen ccm 33-proz. Natronlauge versetzt. Nach Zusatz von gekörntem Kaliumcarbonat goß man die äther. Lösung ab, wusch den Rückstand mit Äther, verdampfte das Lösungsmittel aus den vereinigten und getrockneten äther. Lösungen und erhielt durch fraktionierte Destillation bei 18 Torr vier Fraktionen bei 70°, 82°, 88° und 148°, die Valin-, Prolin-, Leucin- und Phenylalanin-äthylester.

## *Endgruppen-Bestimmungen*

Zur Identifizierung der C-terminalen Endaminosäure<sup>5)</sup> wurden 2 g Peptid zur Veresterung mit 50 ccm Methanol und 10 ccm Acetanhydrid 20 Stdn. stehengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels auf dem Wasserbad, Aufnehmen des Rückstandes in Methanol und

Wiederholung dieser Operation löste man in wenig Methanol und fällte mit Wasser ein kristallines, weißes Produkt aus. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 4 g Lithiumborhydrid zu einer Aufschämmung von 1 g des Peptidesters in 50 ccm absol. Tetrahydrofuran. Nach etwa 30 stdg. Erhitzen unter Feuchtigkeitsausschluß und unter Rückfluß bei einer Badtemperatur von 75–80° versetzte man mit 125 ccm Äthanol und etwas Wasser, kochte die entstandene Fällung mit Alkohol aus, dampfte das Lösungsmittel der vereinigten Filtrate ab, behandelte den krist. Rückstand zur Hydrolyse mit Salzsäure und versetzte nach Abdampfen zur Trockne nach der Vorschrift von F. SANGER<sup>10)</sup> mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol. Überschüssiges Reagenz ließ sich durch Zugabe von Glykokoll entfernen. Nach Abdampfen des Alkohols und Hinzufügen von Wasser enthielt der gelbe Ätherauszug den DNP-Aminoalkohol, die wäßrige Lösung die DNP-Säuren. Nach Abdampfen des Äthers blieb das DNP-Valinol in Nadeln vom Schmp. 76° zurück.

Zwecks Ermittlung der C-endständigen Aminosäure nach R. A. TURNER<sup>6)</sup> wurden 5–10 ccm Peptid mit 0.75 ccm Acetanhydrid und 0.5 ccm Pyridin im abgeschmolzenen Reagenzglas 5–6 Stdn. auf 150° erhitzt. Nach Abdampfen und mehrmaligem Aufnehmen mit Wasser wurde mit 6 n HCl bei 110° im zugeschmolzenen Reagenzglas hydrolysiert. Die pc-Analyse im System Butanol/Eisessig/Wasser (40:10:10) und die zweidimensionale Trennung im System tert. Butanol/Methyläthylketon/Wasser (40:20:20) einerseits und tert. Butanol/Methanol/Wasser (40:50:10) andererseits zeigten die Anwesenheit von Prolin, Phenylalanin und Leucin.

Um nach der Vorschrift von FRAENKEL und HARRIS<sup>7)</sup> die N-terminale Endaminosäure zu identifizieren, wurden 50 mg des Peptids mit 0.24 ccm Phenylsenföl umgesetzt. Nach Einstellung mit 0.1 n NaOH auf pH 8–9 und Extraktion des Überschusses an nicht umgesetztem Senföl mit Benzol wurde die wäßrige Lösung i. Vak. zur Trockne gedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und durch Zugabe von 6 n HCl ungefähr 1 n salzsauer gemacht. Das IR-Spektrum des Phenylthiohydantoin der N-terminalen Aminosäure, das durch Extraktion der sauren Lösung mit Essigester und Abdampfen zur Trockne erhalten wurde, enthielt alle für diese Verbindungen charakteristischen Maxima. Das Fehlen der die NH-Bindungen kennzeichnenden Banden im Gebiet von 3.15–3.30 und 1.50–1.53  $\mu$  bewies, daß es sich um PTH-Prolin handelt.

Zur Isolierung des DNP-Peptids wurden 0.5 g des Peptids in Alkohol gelöst, 0.5 g NaHCO<sub>3</sub> zugegeben und 0.5 ccm 2,4-Dinitro-fluorbenzol hinzugefügt. Nach mehrstündigem Schütteln setzte sich eine hellgelbe Substanz ab. Der nach Abdampfen des Alkohols zurückbleibende Trockenrückstand wurde in Wasser aufgenommen, die Lösung angesäuert und mit Essigester extrahiert. Das nach dem Abdestillieren des Essigesters zurückbleibende Produkt schmolz bei 250–252°.

#### *Methoxyl-Bestimmung*

Zur Methoxyl-Bestimmung nach MATHERS und PRO<sup>9)</sup> wurden 100 mg Substanz durch Erhitzen unter Rückfluß mit 50 ccm verd. Schwefelsäure verseift und anschließend destilliert. Unter Eiskühlung wurde das Destillat mit einer Kaliumpermanganatlösung, bereitet durch Auflösen von 3 g Kaliumpermanganat in 15 ccm 85-proz. Phosphorsäure und Auffüllen mit dest. Wasser auf 100 ccm, oxydiert. Überschüss. Oxydationsmittel zerstörte man nach 1/2 stdg. Stehenlassen im Eisbad durch Zugabe von festem Natriumhydrogensulfit und setzte zur Kondensation des gebildeten Formaldehyds wenige ccm frisch bereiteter Chromotropsäure-Lösung und anschließend etwa 10 ccm konz. Schwefelsäure hinzu. Die Lösung erwärme man 30 Min. auf 55–65°. Das UV-Spektrum, gegen die Lösung des Blindwertes gemessen, zeigte das für dieses Kondensationsprodukt charakteristische Maximum bei 570 m $\mu$ .

<sup>10)</sup> Biochem. J. 39, 507 [1945].