

FRIEDRICH WEYGAND und WOLFGANG STEGLICH

Peptidsynthesen mit aktivierten Estern in Eisessig, I

Synthesen mit Carbobenzoxy-Derivaten*)

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 27. Juni 1960)

*Meinem Lehrer Richard Kuhn in Dankbarkeit und Verehrung zum 60. Geburtstag
F. Weygand*

Aktivierte Ester, vor allem die Thiophenylester von Z-Aminosäuren oder Peptiden können mit vielen Aminosäuren oder Peptiden in heißem bis siedendem Eisessig meist unter Erhaltung der optischen Aktivität beider Komponenten umgesetzt werden. Auf diese Weise wurden 15 Z-Dipeptide, 4 Z-Tripeptide, 3 Z-Tetrapeptide, 1 Z-Pentapeptid und 2 Z-Hexapeptide zur Erprobung des neuen Verfahrens dargestellt. Die Reaktion ist zweiter Ordnung. Parallel mit der Peptidbildung verläuft die Acetylierung der Aminosäuren, deren Geschwindigkeit geringer ist als die der Peptidbildung. Nur bei sterisch gehinderten Aminosäuren sind beide Geschwindigkeiten ähnlich. In diesen Fällen kann durch Verwendung eines Überschusses an den aktivierten Estern oder durch differentielle Zugabe der Aminosäuren der Peptidsynthese der Vorrang gegeben werden.

Meist werden Dipeptide nach folgendem Schema aufgebaut, das sinngemäß auch auf Tripeptide und höhere Peptide anwendbar ist¹⁾.

Schema A

1. Aminosäure A \longrightarrow Acyl-aminosäure A
2. Aminosäure B \longrightarrow Aminosäure B-esterhydrochlorid
3. Aktivierung und Peptidsynthese zu Acyl-peptidester
4. Acyl-peptidester \longrightarrow Acyl-peptid
5. Acyl-peptid \longrightarrow Peptid

Bei einigen Kombinationen von Schutzgruppen, z. B. bei Z-Peptidbenzylestern oder N-TFA-Peptidestern können die Schritte 4 und 5 zusammen vorgenommen werden.

Eine wesentliche Vereinfachung ergibt sich, wenn die Aminosäure B ohne Schutzgruppe eingesetzt werden kann.

*) Verwendete Abkürzungen: Z = Carbobenzoxy; TFA = Trifluoracetyl; Phth = Phthalyl; TFE = Trifluoressigsäure; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid. Peptide werden in der verkürzten Schreibweise wiedergegeben, z. B. L-Alanyl-L-leucin als H · L-Ala · L-Leu · OH, Carbobenzoxy-L-alanyl-L-leucin als Z · L-Ala · L-Leu · OH, dessen Thiophenylester als Z · L-Ala · L-Leu · SC₆H₅ (vgl. F. SANGER und H. TUPPY, *Biochem. J.* **49**, 463 [1951]; E. BRAND, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **47**, 187 [1946]). — Über die bereits abgeschlossenen Peptidsynthesen mit aktivierten Estern von N-TFA-Aminosäuren und Phthalyl-aminosäuren wird in der II. und III. Mitteil. dieser Reihe berichtet werden (mit A. PROX und J. KÄELICKE).

¹⁾ Vgl. die ausführlichen zusammenfassenden Darstellungen: a) W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* **13**, 475, Verlag von Julius Springer Wien 1956; b) M. GOODMAN und G. W. KENNER, *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, Inc. **12**, 496, New York 1957; c) J. S. FRUTON, ebenda **5**, 27, New York 1949.

Schema B

1. Aminosäure A \longrightarrow Acyl-aminosäure A
2. Aktivierung und Peptidsynthese mit Aminosäure B zu Acyl-peptid
3. Acyl-peptid \longrightarrow Peptid

Zahlreiche Acyl-peptide sind auf diese Weise gewonnen worden, z. B. aus Z-Aminosäure-chloriden oder -aziden mit Aminosäuren oder Peptiden in alkalischem Medium²⁾.

Folgende Nachteile müssen hierbei in Kauf genommen werden:

a) Die Umsetzung in wäßrig-alkalischem Medium führt neben der Aminolyse auch zur Hydrolyse. Hierdurch wird die Reinigung erschwert und die Ausbeuten werden erniedrigt.

b) Die Acyl-aminosäure-chloride und besonders die Acyl-peptid-chloride werden durch Baseneinwirkung leicht racemisiert. Dies scheint bei den Aziden nicht der Fall zu sein. Ihnen wird daher der Vorzug gegeben³⁾. Allerdings ist ihre Umsetzung mit ungeschützten Aminosäuren oder Peptiden nur zum Abschluß einer Peptidsynthese vorteilhaft, da die Azide meist über die Ester dargestellt werden.

c) Bei der Aktivierung der Acyl-aminosäuren oder Acyl-peptide nach der Methode der gemischten Anhydride mit organischen Säuren⁴⁾ besteht die Gefahr der falschen Aufspaltung⁵⁾ und der Racemisierung, insbesondere die der Racemisierung bei den gemischten Anhydriden von Acyl-dipeptiden und höheren Peptiden^{1a, 1b)}. Ähnliches gilt für die unsymmetrischen Anhydride mit Schwefelsäure⁶⁾.

Besonders geeignet zur Umsetzung mit Aminosäuren in alkalischem Medium scheinen die aktivierten Ester von Acyl-aminosäuren zu sein, womit sich TH. WIELAND⁷⁾, R. SCHWYZER⁸⁾ sowie G. W. KENNER⁹⁾ und Mitarbb. eingehend beschäftigt haben.

In neutralem Medium sind die aktivierten Thiophenylester von Z-Aminosäuren bemerkenswert stabil. Beim Erhitzen in siedendem wäßrigem Dioxan unter Aminosäurezusatz bildet sich praktisch kein Peptid⁷⁾. KENNER und Mitarbb.⁹⁾ haben eingehend die mögliche Racemisierung von Z-Dipeptid-aktivierten Estern bei der Peptidsynthese mit Aminosäuren untersucht. Zwar liefert Z·Gly·L-Phe·OC₆H₄NO₂(p) mit Glycin in wäßrig alkalischem Dioxan optisch reines Z·Gly·L-Phe·Gly·OH. Dagegen tritt bei der Synthese von Z·Gly·L-Ala·L-Phe·Gly·OH aus Z·Gly·L-Ala·SC₆H₄NO₂(p) und H·L-Phe·Gly·OH eine Racemisierung in der Alanin-Gruppierung bis zu 50 % auf. Die unterschiedliche Azlactonbildungstendenz und die unterschiedliche Peptidbildungsgeschwindigkeit sind für die mögliche Racemisierung verantwortlich. Durch mühsame Gegenstromverteilung konnten KENNER und Mitarbb.⁹⁾ das Z-Tetra-peptid in optisch reiner Form isolieren.

²⁾ Diesem Schema fügen sich auch die Umsetzungen mit Oxazolidin-2.5-dionen (Leuchs'sche Körper), 2-Thio-thiazolidin-5-onen und Oxazolonen (Azlactone) ein. Die Bedeutung dieser Verbindungen für die Gewinnung definierter optisch aktiver Oligopeptide ist gering.

³⁾ Vgl. K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEYER und H. KAPPELER, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1636 [1957]; M. B. NORTH und G. T. YOUNG, Chem. and Ind. **1955**, 1597.

⁴⁾ TH. WIELAND und R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. **569**, 122 [1950]; TH. WIELAND und H. BERNHARD, ebenda **572**, 190 [1951]; R. A. BOISSONAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 [1951]; J. R. VAUGHAN JR., J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 [1951].

⁵⁾ A. R. EMERY und V. GOLD, J. chem. Soc. [London] **1950**, 1443.

⁶⁾ D. W. CLAYTON, J. A. FARRINGTON, G. W. KENNER und J. M. TURNER, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1398.

⁷⁾ TH. WIELAND, W. SCHÄFER und E. BOKELMANN, Liebigs Ann. Chem. **573**, 99 [1951], und spätere Mitteilungen.

⁸⁾ R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **36**, 414 [1953]; R. SCHWYZER, B. ISELIN und M. FEURER, ebenda **38**, 69 [1955], und spätere Mitteilungen.

⁹⁾ J. A. FARRINGTON, P. J. HEXTALL, G. W. KENNER und J. M. TURNER, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1407.

Einen Überblick über die von 1930 bis 1958 nach dem Schema B dargestellten Z-Peptide gibt die folgende Übersicht¹⁰⁾:

Aktivierung über	Zahl der Acyl-peptide
Chlorid	121
Gemischte Anhydride von Carbonsäuren	107
Azid	44
Gemischte Anhydride mit Schwefelsäure	24
Aktivierte Ester (Aryl- und Thioaryl-)	23

Auf Grund der geschilderten Nachteile ziehen die meisten Autoren das Schema A vor¹¹⁾. Es kann jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß es auch hierbei Schwierigkeiten geben kann. So muß bei Acyl-peptidestern mit sterisch gehinderten Aminosäuren bei der Verseifung mit einem teilweisen Angriff auf die Carbobenzoxygruppe¹²⁾, die Phthalylgruppe¹³⁾ und sogar auf Peptidbindungen gerechnet werden. Weiterhin kann längerdauernde Alkalieinwirkung zur teilweisen Racemisierung führen¹⁴⁾.

Viele Nachteile bei der Peptidsynthese mit aktivierten Estern sollten sich vermeiden lassen, wenn nichtalkalische, nichtwäßrige Medien verwendet werden könnten. Solchen Versuchen war bisher kein Erfolg beschieden, meist infolge der Schwerlöslichkeit der Aminosäure in den angewandten Lösungsmitteln. Es wurden verwendet: Methanol⁷⁾, Dioxan¹³⁾, tert.-Butanol¹⁴⁾ und Dimethylformamid¹⁵⁾, z. T. in Mischung mit Wasser. 1958 fanden F. WEYGAND und A. RÖPSCH¹⁶⁾, daß sich Aminosäuren und Peptide durch Erhitzen mit Trifluoressigsäure-phenylester in den meisten Fällen glatt *N*-trifluoracetylieren lassen, wobei die optische Aktivität erhalten bleibt. Es wurde auch versucht, auf analoge Weise aus *N*-TFA-Aminosäure-phenylestern und freien Aminosäuren *N*-TFA-Dipeptide zu erhalten. Dies gelang auch mit den aktivierten Estern von *N*-TFA-Glycin, wobei z. B. optisch reines *N*-TFA-Glycyl-L-leucin erhalten wurde. Mit den aktivierten Estern von optisch aktiven Aminosäuren fand jedoch stets Racemisierung statt¹⁷⁾.

Wir haben nunmehr versucht, ohne Lösungsmittel Z-Aminosäure-thiophenylester mit Aminosäuren durch Erhitzen auf 170–210° zur Reaktion zu bringen. Hierbei gingen die Aminosäuren schnell in Lösung und das bei der Peptidbildung entstehende Thiophenol verdampfte. Außer Z·Gly·Gly·OH (49% d. Th.) wurde auch Z·L·Leu·Gly·OH (11%), ferner Z·L·Ala·L·Val·OH (53%) und schließlich Z·Gly·DL·Ala·Gly·OH (57%) erhalten. Die Z-Peptide zeigten beim Einsatz der optisch aktiven Komponenten die volle spezif. Drehung, ebenso der zurückgewonnene aktive Ester. Die Methode läßt sich aber nicht allgemein anwenden, da z. B. mit Glycin erhebliche Zersetzung eintritt und beim Versuch der Darstellung von

¹⁰⁾ Eigene, vielleicht nicht ganz vollständige Zählung.

¹¹⁾ Vgl. M. BODANSZKY und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 [1959], die stets die Z-Aminosäure-*p*-nitrophenylester einsetzen und bei einer neuen Synthese des Oxytocins jeweils am Aminoende nur eine Aminosäure anbauen.

¹²⁾ z. B. J. A. MACLAREN, Australian J. Chem. **11**, 360 [1958].

¹³⁾ z. B. J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1367 [1956].

¹⁴⁾ TH. WIELAND, Angew. Chem. **71**, 422 [1959].

¹⁵⁾ G. W. KENNER, Mündl. Mitteil., 2. Europ. Peptidsymposium München 1959.

¹⁶⁾ Chem. Ber. **92**, 2095 [1959].

¹⁷⁾ s. die zweite, in Vorbereitung befindliche Mitteil. dieser Reihe.

Z·L-Leu·L-Leu·OH an dessen Stelle das Z·L-Leucin-isoamylamid erhalten wurde. Bereits nach 20 Sek. langem Erhitzen auf über 200° wurden 57% des Amids gefaßt.

Wegweisend für die Auffindung eines geeigneten Lösungsmittels war die Beobachtung, daß bereits durch 2 Min. langes Erhitzen von Z·Gly·SC₆H₅ in geschmolzenem Ammoniumacetat auf 100° das Z·Glycin-amid in 81-proz. Ausbeute entstand. Ferner bildete sich Z·L-Leu·NH₂ durch 9 Min. langes Erhitzen des Thio-phenylesters in Ammoniumacetat auf 125° in 79-proz. Ausbeute.

AUSFÜHRUNG UND UMFANG DER NEUEN METHODE

In weiterer Ausgestaltung der oben erwähnten Beobachtungen haben wir die Umsetzung von aktivierten Z·Aminosäure-estern mit Amin-acetaten vor allem in Eisessig durchgeführt. So ließen sich Z·Glycin-piperidid, Z·L-Leucin-isoamylamid und Z·L-Leucin-amid darstellen.

Bei der Umsetzung mit Aminosäuren und Peptiden wurden die in Tab. 1 aufgeführten Z-Peptide gewonnen. Als Acyl-Gruppen dienten bis jetzt der Z-, der TFA-

Tab. 1. Durch Erhitzen von Z-Aminosäure-thiophenylestern oder Z-Peptid-thiophenylestern mit Aminosäuren oder Peptiden in siedendem Eisessig dargestellte Z-Peptide

Nr. a)	Z-Peptid	Zeit (Min.)	Ausb. (%)	Molverhältnis Thiophenylester: Aminosäure oder Peptid
1	Z·Gly·Gly·OH	60	92	1:1
2	Z·Gly·L-Ala·OH	60	75	1:1
3	Z·Gly·DL-Val·OH	60	90	1:1
4	Z·Gly·L-Leu·OH	120	86	1:1
5	Z·Gly·L-Prol·OH	90	55	1:1
6	Z·Gly·L-Meth·OH	120	78	1:1
7	Z·Gly·L-Phe·OH	30	76	1:1
8	Z·Gly·L-Try·OH	120	56	1:1
9	Z·Gly·DL-O-Bz-Ser·OH	90	52	2:1
10	Z·L-Ala·Gly·OH	120	82	1:1
11	Z·L-Ala·L-Val·OH	300	76	1:1
12	Z·L-Leu·Gly·OH	250	77	1:1.2
13	Z·L-Leu·L-Ala·OH	630	43	1:1.6
14	Z·L-Phe·Gly·OH	90	85	1:2
15	Z·L-Asp(β-OCH ₃)·Gly·OH ^{b)}	120 ^{c)}	54	1:1
16	Z·Gly/·Gly·Gly·OH ^{d)}	90	76	1:1
17	Z·Gly/·Gly·L-Leu·OH	180	87	1:1
18	Z·Gly·L-Leu/·Gly·OH	120	68	1:2
19a	Z·L-Ala·Gly/·Gly·OH	120	84	1:2
19b	Z·L-Ala/·Gly·Gly·OH	90	50	1:1
20	Z·Gly·L-Ala/·L-Phe·Gly·OH	120	17 ^{e)}	1:1
21a	Z·L-Ala/·Gly·Gly·L-Leu·OH	90	68	2:1
21b	Z·L-Ala·Gly·Gly/·L-Leu·OH	70	61	1:2
22	Z·L-Phe·Gly/·L-Ala·L-Val·OH	60	85	1:2
23	Z·L-Ala·Gly·Gly/·L-Leu·Gly·OH	90	58	1:1
24	Z·Gly·Gly·Gly/·Gly·Gly·Gly·OH	120	87	1:1.5
25	Z·L-Ala·Gly·Gly/·L-Ala·Gly·Gly·OH	60	67	1:1

a) Die Darstellung der Peptide ist im Versuchsteil unter den gleichen Nummern beschrieben.

b) Unter Verwendung von Z·L-Asp(β-OCH₃)-α-p-nitrophenylester, dankenswerterweise von den FARBWERKEN HOECHST AG, vormals MEISTER LUCIUS & BRÜNING, überlassen.

c) Reaktionstemperatur 100°.

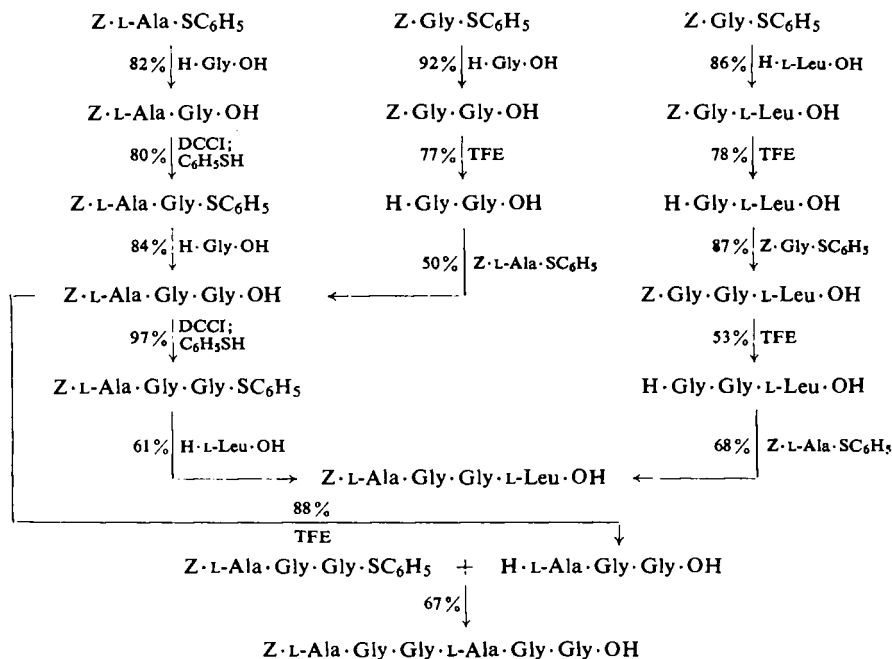
d) Die Schrägstriche geben die Verknüpfungsstelle bei der Peptidsynthese an.

e) Neben 50% des Diketopiperazins aus Phe·Gly.

Alle Ausb. beziehen sich auf die im Unterschluß eingesetzte Komponente.

und der Phth-Rest, als aktivierte Ester wurden verwendet der $-\text{OC}_6\text{H}_5$ -, $-\text{SC}_6\text{H}_5$ -, $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2(p)$ - und $-\text{SC}_6\text{H}_4\text{NO}_2(p)$ -Rest. In der vorliegenden Mitteil. wird nur über Versuche mit dem Z-Rest berichtet¹⁸⁾. Wir haben meist die Thiophenylester, gelegentlich auch die anderen aktivierten Ester herangezogen. Im Gegensatz zu allen anderen Peptidsynthesen mit aktivierten Estern wird keine Base oder Puffer zugesetzt. Die experimentelle Ausführung ist sehr einfach, ebenso die Aufarbeitung und Isolierung der Z-Peptide. Als Nebenreaktion verläuft die Acetylierung der Aminosäuren¹⁹⁾, worauf weiter unten noch näher eingegangen wird.

Die Carbobenzoxy-peptide fallen z. T. als langsam kristallisierende Öle an, wie z. B. Z·L-Leu·L-Leu·OH. Es empfiehlt sich dann, die Dicyclohexylaminsalze herzustellen²⁰⁾. Die Kondensation in Eisessig ist auch zur Herstellung mittlerer Oligopeptide geeignet. So wurde z. B. Z·L-Ala·Gly·Gly·L-Leu·OH entsprechend dem nachstehenden Schema durch verschiedenartige Kombination der Bausteine dargestellt. (Die Ausbeuten sind bei verschiedenen Schritten noch wesentlich steigerungsfähig, die Abspaltung des Z-Restes geschah durchweg mit Trifluoressigsäure²¹⁾.)



Bei fast allen in dieser Mitteilung beschriebenen Z-Peptiden wurde keine oder fast keine Racemisierung beobachtet. Gelegentlich kamen Handelsproben von Aminosäuren zur Verwendung, die nicht die volle optische Drehung zeigten. Besonders

¹⁸⁾ Bezüglich der N-TFA- und Phth-Verbindungen s. die II. und III. in Vorbereitung befindliche Mitteil. dieser Reihe.

¹⁹⁾ E. A. BELL, J. chem. Soc. [London] 1958, 2423.

²⁰⁾ Zuerst bei N-TFA-Peptiden von F. WEYGAND und M. REIHER, Chem. Ber. 88, 26 [1955], angewandt.

²¹⁾ F. WEYGAND und W. STEGLICH, Z. Naturforsch. 14b, 472 [1959].

L-Phenylalanin scheint nur schwer in reinem Zustand erhältlich zu sein. Das aus Z·Gly·L-Leu·SC₆H₅ und Glycin dargestellte Z·Gly·L-Leu·Gly·OH zeigte nach Abspaltung des Carbobenzoxyrestes eine Drehung von -43.8° (in Wasser) (Lit.²²⁾: -43.3°). Unser besonderes Interesse galt dem schon erwähnten Z-Peptid KENNERS, dem Z·Gly·L-Ala·L-Phe·Gly·OH⁹⁾. Die Hauptfraktion zeigte sofort nach der Darstellung aus Z·Gly·L-Ala·SC₆H₅ und dem Dipeptid den gleichen Schmp. und dieselbe Drehung, wie sie von KENNER für die optisch reine Verbindung ermittelt wurden.

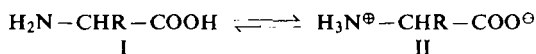
Zusatz von Natriumacetat bei der Kondensation erniedrigte in den beiden untersuchten Fällen der Synthese von Z·L-Ala·Gly·OH und Z·L-Leu·Gly·OH die optische Reinheit nicht.

Racemisierung trat in siedendem Eisessig nur bei der Kondensation der Thiophenylester mit *O*-Benzyl-L-serin und *S*-Benzyl-L-cystein ein. Wahrscheinlich ist hierfür das zum optisch aktiven Kohlenstoffatom β -ständige Heteroatom verantwortlich, das, besonders wenn es in der Oxoniumstruktur vorliegen kann, zusätzlich zu den beiden anderen nachbarständigen Gruppen labilisierend auf das Wasserstoffatom am Aktivitätszentrum wirkt. Doch kann durch Herabsetzung der Reaktionstemperatur bei längeren Reaktionszeiten die Racemisierung hinten gehalten werden. Von den untersuchten Aminosäuren bzw. Derivaten lösen sich nur Cystin und Nitro-arginin sehr schwer in Eisessig. Auf Untersuchungen mit Glutamin und Asparagin, die Besonderheiten bieten, kommen wir später zurück. Bekannt ist, daß Glutamin sich in Eisessig zu Pyrrolidoncarbonsäure unter Abspaltung von Ammoniak cyclisiert¹⁹⁾. In beiden Fällen werden Amide der Z-Aminosäuren erhalten.

Die für die Synthesen benötigten Z-Aminosäure-thiophenylester wurden aus den Z-Aminosäuren und Thiophenol mittels Dicyclohexylcarbodiimids hergestellt²³⁾. Auch die POCl₃-Methode von TH. WIELAND²⁴⁾ wurde häufig angewandt. Z-Peptid-thiophenylester ließen sich ohne Racemisierung in den meisten Fällen nur mittels Dicyclohexylcarbodiimids gewinnen.

EISESSIG ALS REAKTIONSMEDIUM

Die Löslichkeit von Aminosäuren wird durch ihre Zwitterionenstruktur bestimmt. In festem Zustand und in stark polaren Lösungsmitteln, wie in Wasser, liegen sie fast ausschließlich in der energieärmeren Betainform vor. Die Umwandlung



ist mit einem Energiegewinn von 10700 bis 12300 cal/Mol verbunden²⁵⁾. Das Verhältnis Konz. II: Konz. I ist daher in wäßriger Lösung sehr groß, z. B. für Glycin

²²⁾ F. C. MCKAY und N. F. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4686 [1957].

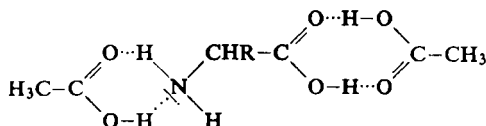
²³⁾ D. F. ELLIOT und D. W. RUSSEL, Biochem. J. **66**, 49 [1957]; M. ROTHE und F. W. KUNITZ, Liebigs Ann. Chem. **609**, 88 [1957]. Ester von Carbonsäuren wurden schon 1950 mittels Dicyclohexylcarbodiimids dargestellt (E. SCHMIDT und R. SCHNEGG); vgl. Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. 8, S. 521, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1952.

²⁴⁾ TH. WIELAND und B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **615**, 184 [1958].

²⁵⁾ E. J. COHN und J. T. EDSALL in Proteins, Amino Acids and Peptides, Kapitel 4, Reinhold, New York 1943.

und Alanin 260000. In den viel weniger polaren organischen Lösungsmitteln sind Aminosäuren daher im allgemeinen nur sehr schwer löslich. Die elektrische freie Energie wächst in dem Maße, wie die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels abnimmt. Da die freie Energie des Gesamtsystems einem Minimum zustrebt, wird die Zahl der Dipolmoleküle, die sich in die ungeladene Form umlagern, abnehmen. So beträgt das Verhältnis Konz. II: Konz. I in 90-proz. Äthanol für Glycin nur noch 1000, für Alanin und Leucin 500. Die dazu notwendige Energiezufuhr erklärt die geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Äthanol, Aceton usw.

Im Gegensatz dazu lösen sich verschiedene Aminosäuren relativ leicht in heißem Eisessig. Essigsäure bildet nur mit starken Basen stabile Salze. Mit organischen Aminen in schwach polaren Lösungsmitteln reagiert sie in einer Art Vorneutralisation²⁶⁾. Es ist anzunehmen, daß auch die Aminosäuren über Wasserstoffbrücken mit dem Eisessig in Beziehung treten, wobei sich Komplexe der Form



bilden. Dadurch wird die Aminosäureform I stabilisiert und das Gleichgewicht $I \rightleftharpoons II$ zu Gunsten von I verschoben.

In den entstehenden Komplexen ist das freie Elektronenpaar der Aminogruppe für die Reaktion mit den aktivierten Estern verfügbar. Bemerkenswerterweise findet in Ameisensäure und Monochloressigsäure ($K_a = 1.77 \cdot 10^{-4}$ bzw. $1.4 \cdot 10^{-3}$ gegen $1.75 \cdot 10^{-5}$ der Essigsäure in Wasser) keine Peptidbildung mit aktivierten Estern mehr statt. Die Aminosäuren liegen in diesen Solventien infolge der größeren Säurestärke und Polarität wohl schon als Salze vor. Peptide sind in heißem Eisessig im allgemeinen besser löslich als die zugehörigen Aminosäuren, was mit der geringeren Tendenz zur Ausbildung der Zwitterionenstruktur zusammenhängt.

REAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN UND MECHANISMUS

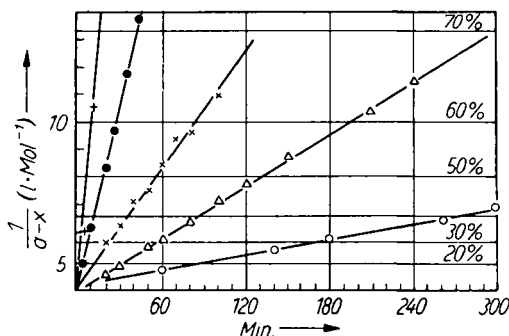
Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Z-Aminosäure-thiophenylestern und Aminosäuren in heißem Eisessig hängt stark von den die Peptidbindung eingehenden Aminosäuren ab. Wir haben die Reaktion durch jodometrische Bestimmung des gebildeten Thiophenols in gewissen Zeitabständen²⁷⁾ kinetisch verfolgt. Im $\frac{1}{c}/t$ -Diagramm ergeben sich mit guter Annäherung Geraden, die für eine Reaktion zweiter Ordnung charakteristisch sind (vgl. Abbild. 1).

Bei der angewandten Meßmethode treten eine Reihe von Fehlern auf:

a) Die Ausbeute/Zeit-Kurven (Abbild. 2) nähern sich Grenzwerten, die für jedes Beispiel charakteristisch sind. Sie liegen um so niedriger, je langsamer die Reaktion verläuft. Selbst bei der Synthese von Z-Gly-Gly-OH wird beim äquiv. Einsatz der Komponenten nur eine

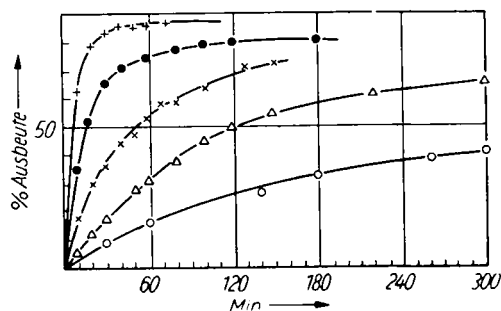
²⁶⁾ L. SOBCZYK, Hydrogen Bonding, S. 323, Pergamon Press London 1959.

²⁷⁾ R. KUHN, L. BIRKOFER und F. W. QUACKENBUSCH, Ber. dtsh. chem. Ges. 72, 407 [1939].



Abbild. 1. Umsetzung von Z-Aminosäure-thiophenylestern mit Aminosäuren in Eisessig bei 118°: $\frac{1}{c}/t$ -Diagramm.

Die zur Abszisse parallelen Geraden geben die Thiophenolabbeuten an. Zeichenerklärung:
 + — + Z·Gly·SC₆H₅ + H·Gly·OH; • — • Z·Gly·SC₆H₅ + H·L-Ileu·OH; x — x Z·Gly·SC₆H₅ + H·L-Pro·OH; Δ — Δ Z·L-Ala·SC₆H₅ + H·L-Ala·OH; o — o Z·L-Leu·SC₆H₅ + H·L-Ala·OH



Abbild. 2. Umsetzung von Z-Aminosäure-thiophenylestern mit Aminosäuren in Eisessig bei 118°: Thiophenolabspaltung/ t -Diagramm. Zeichenerklärung s. Abbild. 1

Ausbeute von 86% d. Th. erreicht. Dies bedeutet, daß die im $\frac{1}{c}/t$ -Diagramm erhaltenen Geraden bei höheren Umsätzen in flachere Kurven übergehen. Hierfür sind vor allem zwei Faktoren verantwortlich:

a₁) Die jodometrische Titration von Mercaptanen gibt meist zu geringe Werte. Die erhaltenen Werte liegen, wie sich durch besondere Versuche ergab, meist 5–10% zu tief. Ferner wird bei längerem Erhitzen etwas Thiophenol von Luftsauerstoff zu Disulfid dehydriert.

a₂) Von viel größerem Einfluß ist der Fehler, der durch die gleichzeitig erfolgende Acetylierung der Aminosäuren verursacht wird. Dies kann man leicht demonstrieren, indem man einem Ansatz, der den Grenzwert erreicht hat, wieder etwas freie Aminosäure zusetzt: Die Peptidsynthese setzt erneut ein unter Abspaltung von Thiophenol. Dagegen ist die Zugabe von Z-Aminosäure-thiophenylester in diesem Stadium ohne Einfluß. In die gefundenen Ausbeute/Zeit-Kurven gehen daher die gleichzeitig erfolgende Peptidbildung und die Acetylierung ein.

b) Die Aminosäuren lösen sich bei den angewandten Konzentrationen von 0.15 oder 0.25 Mol/l bei 100 oder 118° in Eisessig erst innerhalb von 0.5–5 Min., was bei den langsamer in Lösung gehenden Aminosäuren zu einer scheinbaren Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

c) Durch die Acetylierung bilden sich geringe Mengen Wasser. Die dadurch mögliche Hydrolyse verläuft aber, wie eine Messung zeigte, noch langsamer als die Acetylierung. Das durch die Hydrolyse frei werdende Thiophenol wird ebenfalls erfaßt.

d) Die Titrier-, Volumen- und Zeitfehler fallen gegenüber den vorgenannten kaum ins Gewicht.

Trotz dieser Nachteile sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten zum Vergleich der relativen Geschwindigkeiten gut geeignet. Sie sollten aber nicht im strengen physikalisch-chemischen Sinne betrachtet werden.

Zur Auswertung wurde die graphische Methode benutzt. Tab. 2 gibt einen Überblick über die erhaltenen Werte. Die angegebenen Fehler wurden auf Grund der Abweichungen im Bereich der Geraden abgeschätzt.

Tab. 2. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Umsetzung von Z-Aminosäure-thio-phenylestern mit Aminosäuren bei 118°

Dargestelltes Z-Peptid	$k_2 \cdot 10^4$ (l. Mol ⁻¹ · sec ⁻¹)	Relative Reaktions- geschwindigkeit k_2 für Z·Gly·Ala·OH = 1	Grenzausbeuten (in % d. Th.) bei 1:1 Mol, durch Titration des Thio- phenols bestimmt
Z·Gly·β-Ala·OH	44 ± 4	6.6	
Z·Gly·Gly·OH	30.1 ± 4	4.47	86
Z·Ala·Gly·Gly·OH	29.5 ± 2	4.40	84
Z·Gly·Ileu·OH	9.7 ± 0.5	1.45	81
Z·Gly·Meth·OH	8.4 ± 0.5	1.25	80
Z·Gly·Val·OH	7.9 ± 0.6	1.18	83
Z·Gly·Phe·OH	7.5 ± 0.5	1.12	77
Z·Gly·Leu·OH	7.4 ± 0.5	1.10	77
Z·Gly·O-Bz-Ser·OH	7.3 ± 0.5	1.09	71
Z·Gly·Ala·OH	6.7 ± 0.5	1.00	79
Z·Gly·Try·OH	6.1 ± 0.4	0.91	83
Z·Ala·Gly·OH	4.8 ± 0.4	0.72	76
Z·Gly·Prol·OH	2.9 ± 0.3	0.43	72
Z·Gly·Sarc·OH	2.6 ± 0.3	0.39	72
Z·Phe·Gly·OH	2.4 ± 0.2	0.36	61
Z·Leu·Gly·OH	2.3 ± 0.3	0.34	64
Z·Ala·Ala·OH	1.5 ± 0.2	0.22	69
Z·Pro·Gly·OH	1.0 ± 0.2	0.15	51
Z·Ala·Leu·OH	0.9 ± 0.2	0.13	56
Z·Phe·Leu·OH	0.6 ± 0.2	0.09	46
Z·Leu·Leu·OH	0.44 ± 0.05	0.07	46
Z·Leu·Ala·OH	0.40 ± 0.04	0.06	54
Z·Pro·Leu·OH	0.27 ± 0.04	0.04	29

Wir haben auch die Geschwindigkeitskonstanten für die Umsetzung von Z·Gly·SC₆H₅ mit L-Valin bei verschiedenen Molverhältnissen bestimmt. Die erhaltenen Werte stimmen für eine Reaktion zweiter Ordnung befriedigend überein:

Verhältnis Z·Gly·SC ₆ H ₅ : L-Valin	1:1	2:1	3:1	4:1
k_2 (l. Mol ⁻¹ · sec ⁻¹) · 10 ⁴ bei 100°	2.22	1.98	1.98	1.90

Wird umgekehrt die Aminosäurekonzentration gesteigert, so sind die Abweichungen infolge der verzögerten Löslichkeit der größeren Aminosäuremengen beträchtlicher:

Verhältnis Z·Leu·SC ₆ H ₅ : Glycin	1:1	3:1	1:3
$k_2(l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}) \cdot 10^4$	2.3	2.0	1.5

Der Einfluß verschiedener Acyl-Reste wurde bei den Reaktionen zwischen den *N*-TFA-, Phth- und Z-Glycin-thiophenylestern und Glycin bei 100° untersucht. Es ergaben sich folgende Werte

Verbindung	<i>N</i> -TFA·Gly·Gly·OH	Phth·Gly·Gly·OH	Z·Gly·Gly·OH
$k_2 \cdot 10^4$	7.3 ± 0.5	6.7 ± 0.5	5.9 ± 0.5

Zum Vergleich der Reaktionsfähigkeit verschiedener aktivierter Ester wurde Z·Glycin-*p*-nitrothiophenylester mit Alanin bei 118° umgesetzt. Es ergab sich für $k_2 \cdot 10^4 = 9.1 \pm 0.5$. Er setzt sich also etwas schneller als der Thiophenylester um ($k_2 \cdot 10^4 = 6.7 \pm 0.5$). Ferner ergab sich auf Grund von Ausbeutebestimmungen, daß der Phenylester etwas langsamer als der Thiophenylester reagiert. Auf diese Weise wurde $k_2 \cdot 10^4$ zu 2.9 bestimmt.

Der Einfluß der Temperatur wurde nicht genauer untersucht. Zur Orientierung mögen folgende Werte dienen:

Verbindung	Temp.	$k_2 \cdot 10^4$	k_{118}/k_{100}
Z·Gly·Gly·OH	118°	30.1	4.5
	100°	6.7	
Z·Gly·L-Val·OH	118°	7.9	3.3
	100°	2.4	

Zur Bestimmung der Hydrolysengeschwindigkeit wurde Z·Gly·SC₆H₅ mit 3 Moll. Wasser in Eisessig auf 118° erhitzt. Es ergab sich $k_2 \cdot 10^4 = 0.22$. Die Hydrolyse verläuft also viel langsamer als die Peptidsynthese. Es können nur die geringen Mengen Wasser in Reaktion treten, die bei der Bildung von Acetylaminosäuren entstehen.

Schließlich wurde auch die Acetylierungsgeschwindigkeit bestimmt zwecks genauer Berechnung der Grenzausbeuten. Die Acetylierungsgeschwindigkeiten sind erwartungsgemäß nur von der Aminosäurekonzentration abhängig. Aus dem Anstieg im $-\log c/t$ -Diagramm (vgl. Abbild. 3) ergaben sich die in Tab. 3 aufgenommenen Werte.

Auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten lassen sich die Peptidsynthesen aus Z-Aminosäure-thiophenylestern und α -Aminosäuren in 4 Gruppen einteilen:

	$k_2 \cdot 10^4$	
a)	30	Z·Gly·Gly·OH
b)	5—10	Z·Gly·(Ala, Val, Leu, Ileu, Meth, Phe, Try)·OH
c)	2—5	Z·Gly·(Pro, Sarc)·OH
		Z·(Ala, Leu, Phe)·Gly·OH
d)	0.2—2	Z·Pro·Gly·OH
		Z·(Ala, Leu, Phe, Pro)·(Ala, Leu, Pro)·OH

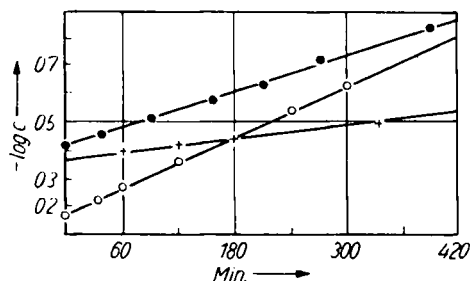
Die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten dürften in erster Linie durch sterische Effekte bedingt sein.

a) Eine Ausnahmestellung nimmt das Paar $Z\cdot\text{Gly}\cdot\text{SC}_6\text{H}_5 + \text{Glycin}$ ein. Es sind keine Seitenketten vorhanden, die einen Einfluß ausüben.

b) Um das 3- bis 6fache geringer ist die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen $Z\cdot\text{Gly}\cdot\text{SC}_6\text{H}_5$ und den Aminosäuren mit Seitenkette, wobei diesen kein allzu deutlicher Einfluß zukommt.

c) Noch erheblich langsamer verläuft die Reaktion mit den sek. Aminogruppen des Prolins und Sarkosins. Es scheint allein der sterische Faktor hierfür verantwortlich zu sein und nicht die gesteigerte Basizität der beiden Aminosäuren [$p_{K'_2}(\text{Prolin}) = 10.60$, $p_{K'_2}(\text{Sarkosin}) = 10.1$ gegenüber $p_{K'_2}(\text{Glycin}) = 9.60$, alle Werte in Wasser²⁵⁾]. Es zeigte sich nämlich, daß die Reaktion des $Z\cdot\text{Gly}\cdot\text{SC}_6\text{H}_5$ mit β -Alanin, das eine ähnliche Basizität wie Prolin und Sarkosin besitzt ($p_{K'_2}$ bei β -Alanin = 10.19) noch schneller verläuft als die mit Glycin. In die gleiche Gruppe gehören die Reaktionen der Z -Aminosäure-thiophenylester, die Seitenketten tragen, mit Glycin.

d) Liegen in beiden Komponenten der Peptidsynthese Seitenketten vor, so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit erneut stark ab und kommt dabei in den Bereich der Acetylierungsgeschwindigkeit.



Abbild. 3. Acetylierung von Aminosäuren in Eisessig bei 118°: $-\log c/t$ -Diagramm.

●—● Leucin, ○—○ Glycin, +—+ Prolin

Tab. 3. Acetylierungsgeschwindigkeit beim Erhitzen von Aminosäuren in Eisessig

Aminosäure	Glycin	Leucin	Prolin	Glycin	Leucin
Temp. (°C)	118	118	118	100	100
$k_1 \cdot 10^5 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	5.76	4.17	1.45	0.98	0.54

GRENZAUSBEUTEN DER PEPTIDSYNTHESE IN EISESSIG INFOLGE ACETYLIERUNG DER AMINOSÄUREN

Die Ausbeute an Z -Peptiden nähert sich Grenzwerten, die in erster Näherung vom Verhältnis der Geschwindigkeiten der Peptidbildung und der Acetylierung abhängen. Die außerdem noch mögliche Hydrolyse ist mit dem bei der Acetylaminosäurebildung entstehenden Wasser verknüpft und verläuft noch langsamer als die Acetylierung. Sie kann daher meist unberücksichtigt bleiben.

Zur Berechnung der Grenzausbeuten bei gleichzeitigem Verbrauch eines Reaktionsteilnehmers durch eine Reaktion erster und zweiter Ordnung läßt sich folgendes Verfahren anwenden²⁸⁾.

²⁸⁾ Herrn Dr. G. KRESZE, Techn. Universität Berlin, danken wir für diese Berechnungsmethode.

Man trägt im Koordinatennetz y, z die Geradenschar

$$z_1 = a - y$$

und die Kurvenschar

$$z_2 = 2.303 \frac{k_1}{k_2} \log \frac{b}{b - y} \text{ auf.}$$

a = Anfangskonzentration der Aminosäure, b = Anfangskonzentration des Z-Aminosäure-thiophenylesters, y = Konzentration des Z-Peptidesters zur Zeit t und k_1/k_2 = Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten.

Die Schnittpunkte entsprechen den y_e -Werten bzw. der maximal erreichbaren Ausbeute an Z-Peptid.

Die nach diesem Verfahren berechneten Grenzausbeuten stimmen mit den gefundenen befriedigend überein, wie sich aus Tab. 4 ergibt.

Tab. 4

Grenzausbeuten an β -Carbobenzoxy-dipeptiden beim Molverhältnis der Komponenten 1:1

Verbindung	ber. %	gef. %	Verbindung	ber. %	gef. %
Z·Gly·Gly·OH	94	86	Z·Ala·Leu·OH	59	56
Z·Gly·Leu·OH	88	77	Z·Pro·Gly·OH	54	51
Z·Ala·Gly·OH	80	76	Z·Phe·Leu·OH	50	46
Z·Phe·Gly·OH	70	61	Z·Leu·Leu·OH	45	46
Z·Leu·Gly·OH	70	64	Z·Pro·Leu·OH	34	29

Aus der Übersicht ergibt sich, daß auch bei den am schnellsten verlaufenden Peptidsynthesen Acetylaminosäuren als Nebenprodukte entstehen. Sie sind in den meisten Fällen leicht abtrennbar. Nur bei der Synthese von Z·L-Leu·L-Leu·OH konnten wir 20% an Acetyl-leucin isolieren. Auf jeden Fall stören die Acetylaminosäuren oder Acetylpeptide nicht mehr nach der Abspaltung des Carbobenzoxyrestes, da die Acetylgruppe hierbei nicht entfernt wird und somit — in allen in dieser Arbeit beschriebenen Fällen — ein neutrales Peptid neben einer sauren Verbindung vorliegt. Bei der Behandlung mit einem schwach basischen Ionenaustauscher wird die saure Acetylverbindung entfernt.

Die Grenzausbeuten werden durch Erhöhung der Konzentration eines Reaktionsteilnehmers zu Gunsten der Peptidbildung verschoben. Der dabei erzielte Effekt ist stark vom Verhältnis k_2/k_1 abhängig. Das Ergebnis der Berechnung für die Synthese von Z·L-Leu·L-Leu·OH ($k_2/k_1 = 1.1$) und Z·L-Leu·Gly·OH ($k_2/k_1 = 4$) zeigt die folgende Zusammenstellung

Mol.-Verhältnis

Z·Aminosäure·SC ₆ H ₅ :Aminosäure	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	10:1	1:2	1:3	1:4
Grenzausbeuten Z·L-Leu·L-Leu·OH	44	64	74	79	83	91	74	89	96
Z·L-Leu·Gly·OH	70	86	91	93	95	—	99		

Die Erhöhung der Aminosäurekonzentration wirkt sich also stärker auf die Peptidausbeute aus als die der Esterkomponente. Trotzdem wird man im allgemeinen bei den Synthesen einen Überschuß an der aktiven Esterkomponente vorziehen, da dieser

leicht wiederzugewinnen ist, während die Aminosäure in teilweise racemisierte Acetylaminosäure übergeht²⁹⁾ und somit verloren ist.

Eine einfache Betrachtung zeigt ferner, daß es zweckmäßig ist, eine gegebene Aminosäuremenge bei der Umsetzung mit einem Z-Aminosäure-thiophenylester in Portionen zuzusetzen, da hierdurch der aktivierte Ester immer im mehrfachen Überschuß vorhanden ist und somit eine höhere Endausbeute erzielt wird und gleichzeitig weniger Acetylverbindung entsteht.

REAKTIONSMCHANISMUS

Die Umsetzung der Z-Aminosäure-thiophenylester mit Aminosäuren verläuft nach einer Reaktion zweiter Ordnung und gehört somit zu einer Gruppe ähnlicher Esterreaktionen, die von INGOLD mit dem Symbol $B_{Ac}2$ bezeichnet wurden³⁰⁾. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt besteht im Angriff der Aminogruppe der Aminosäure auf die Estercarbonylgruppe. Da Aminosäuren und Amine in Eisessig in einer etwas desaktivierten Form vorliegen (s. oben), verlaufen die Peptidsynthesen in Eisessig wesentlich langsamer als in alkalischem Medium. In Eisessig finden sie bei 20° praktisch überhaupt nicht statt, während in alkalischem Medium bei Raumtemperatur oder noch tiefer gearbeitet wird. Ferner ist sehr auffällig, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Aryl- und Thioarylester in Eisessig nur sehr wenig unterscheiden, während bei der Reaktion in alkalischem Medium sehr erhebliche Unterschiede ermittelt wurden. So reagiert der Z-Glycin-*p*-nitrothiophenylester in Eisessig nur rund 3.7 mal schneller mit Alanin als der Phenylester und nur 1.4 mal schneller als der Thiophenylester. Demgegenüber ergaben kinetische Messungen von KENNER³¹⁾, daß das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von *p*-Nitrothiophenylester: Thiophenylester bei der Reaktion mit Alanin in alkalischem Medium 140:1 beträgt. Zur Erklärung dieses Unterschiedes kann man wohl annehmen, daß ein verschiedenartiger Zerfall des Übergangszustandes in den beiden Medien vor sich geht. In Eisessig zerfällt er in Z-Peptid und das entsprechende Phenol oder Thiophenol, in alkalischem Medium hingegen in die Phenolate bzw. Thiophenolate, was durch *p*-ständige Nitrogruppen noch begünstigt wird.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Will man Oligopeptide mit mittlerer Kettenlänge nach dem vorliegenden Verfahren herstellen, so dürfte es ratsam sein, nicht die freien Dipeptide einzusetzen, da diese in manchen Fällen Diketopiperazine bilden können. Das zunächst dargestellte Z-Dipeptid sollte mittels Dicyclohexylcarbodiimids in den aktivierten Ester verwandelt werden, worauf ein Z-Tripeptid gewonnen wird. Nunmehr kann nach Abspaltung des Z-Restes am Aminoende mit den aktivierten Z-Estern von Aminosäuren, Dipeptiden, Tripeptiden usw. kondensiert werden.

Wir danken Frl. D. PFAHL für die überaus geschickte und fleißige Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

²⁹⁾ Im Gegensatz zu BELL¹⁹⁾ fanden wir, daß z. B. das nach wenigen Std. Reaktionszeit entstehende Acetyl-leucin noch teilweise optisch aktiv ist.

³⁰⁾ C. K. INGOLD, *Structure and Mechanism*, Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1953, S. 754 u. 783 ff.

³¹⁾ J. A. FARRINGTON, G. W. KENNER und J. M. TURNER, *Chem. and Ind.* **1955**, 601.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE *)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Carbobenzoxy-peptiden in Eisessig

10 mMol Z-Aminosäure-thiophenylester und 10 mMol Aminosäure werden in 10 bis 20 ccm Eisessig in einem 100–130° warmen Ölbad (Rückflußkühler, CaCl₂-Rohr) erhitzt. Die Reaktionszeiten ergeben sich aus Tab. I. Bei den langsamer verlaufenden Reaktionen empfiehlt es sich, den aktivierten Ester im Überschuß zu verwenden und die Aminosäure portionsweise zuzugeben. Dies wurde in der vorliegenden Mitteil. im allgemeinen noch nicht berücksichtigt. Nach beendeter Reaktion wird der Eisessig i. Vak. abdestilliert, wobei auch ein Teil des Thiophenols entfernt wird.

Nun wird im allgemeinen zwischen Essigester und gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt (bei der Zugabe von Essigester fällt u. U. nicht umgesetzte Aminosäure aus). Durch Einengen der mit Natriumsulfat getrockneten Essigesterlösung und Zugabe von Petroläther wird nicht umgesetzter Z-Aminosäure-thiophenylester zurückerhalten. Er wird vor erneuter Verwendung umkristallisiert und auf seine Konstanten hin überprüft.

Die Natriumhydrogencarbonatlösung wird mit konz. Salzsäure auf p_H 1 bis 2 gebracht. Hierbei kristallisiert häufig das Z-Peptid bereits aus. Es wird abgesaugt oder besser, und falls es als Öl anfällt immer, in Essigester aufgenommen. Nach dem Trocknen der Essigesterlösung mit Natriumsulfat und Einengen i. Vak. wird es mit Petroläther oder Diisopropyläther zur Kristallisation gebracht. Schlecht oder nicht kristallisierende Z-Peptide werden durch Zugabe von Dicyclohexylamin zur Essigesterlösung und Fällen mit Petroläther, der einen evtl. Überschuß an Dicyclohexylamin aufnimmt, ausgefällt. Die Dicyclohexylaminsalze werden aus Essigester/Petroläther oder gelegentlich auch aus Benzol oder wäBr. Alkohol umkristallisiert.

Im übrigen richtet sich die Aufarbeitung nach den Eigenschaften der Z-Peptide und muß daher unter Umständen vollkommen geändert werden (s. Nr. 24 u. 25).

Carbobenzoxy-dipeptide

1. *Z·Gly·Gly·OH*: 18.0 g *Z·Gly·SC₆H₅*^{7,24)} wurden mit 4.5 g *Glycin* in 100 ccm Eisessig 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Ansäuern der Hydrogencarbonatlösung erfolgte sofort Kristallisation. Ausb. 14.7 g (92% d. Th.), Schmp. 178° (Lit.³²⁾: 178°).

2. *Z·Gly·L-Ala·OH*: 9.0 g *Z·Gly·SC₆H₅* wurden mit 2.67 g *L-Alanin***) in 50 ccm Eisessig 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Aus der Natriumhydrogencarbonatlösung kristallisierten beim Ansäuern 4.65 g, Schmp. 147–153° (Sintern ab 139°), $[\alpha]_D^{25}$: –9.85° ($c = 2.64$, in absol. Äthanol) an *Z·Gly·L-Ala·OH* aus. Das Filtrat lieferte durch Ausziehen mit Essigester noch 1.66 g, Schmp. 102–105°, $[\alpha]_D^{25}$: –7.8° ($c = 2.44$, in absol. Äthanol), Schmp. nach Umkristallisieren aus Wasser 125–126°. Gesamtausb. 75% d. Th., unter Berücksichtigung von 1.34 g zurückgewonnenem *Z·Gly·SC₆H₅* 86%.

Beide Fraktionen wurden vereinigt und mit Trifluoressigsäure in *H·Gly·L-Ala·OH* übergeführt: $[\alpha]_D^{25}$: –46.8° ($c = 2.35$, in Wasser) (Lit.³³⁾: –50.4°, –50°).

Im Falle des *Z·Gly·L-Ala·OH* wurden bei zahlreichen Versuchen Produkte mit stark variierendem Schmp. erhalten. Die höher schmelzenden lösten sich z. T. nur unvollständig in Essig-

*) Schmpp. uncorr.; Ausbeuteangaben in % d. Th., gegebenenfalls bezogen auf die im Überschuß angewandte Komponente; Eisessig p. a. von Merck.

**) Das verwendete L-Alanin hatte nicht die volle spezif. Drehung.

³²⁾ M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

³³⁾ B. F. ERLANGER und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3508 [1951]; **74**, 3069 [1952]; E. ABDERHALDEN und A.-L. NEUMANN, Fermentforschung **14**, 133 [1934].

ester. Es könnte sich daher vielleicht um Gemische mit den Natriumsalzen handeln³⁴⁾, was nicht näher untersucht wurde. Auch die in der Lit. angegebenen Schmp. variieren beträchtlich^{6,33,35)}.

3. *Z-Gly·DL-Val·OH*: 0.90 g *Z-Gly·SC₆H₅* und 0.35 g *DL-Valin* wurden in 2 ccm Eisessig unter Rückfluß erhitzt. Es wurden nach der üblichen Aufarbeitung die folgenden Ausb. erhalten:

Erhitzungszeit Min.	5	10	15	20	30	40	60
Ausb. % d. Th.	46	59	71	82	79	89	90
Ausb. % unter Berücksichtigung des zurückgewonnen <i>Z-Gly·SC₆H₅</i>	69	86	77	92	87	93	93

Z-Gly·DL-Val·OH: Schmp. 125—126°, wird fest, 2. Schmp. 143—144°, wie Lit.³⁶⁻³⁹⁾.

Mit Propionsäure wurde bei 130° (Ölbad) nach 40 Min. eine 90-proz. Ausb. erhalten, Erhitzen in Ameisensäure oder Chloressigsäure lieferte nur Spuren Peptid. 48stdg. Rühren in Eisessig bei Raumtemperatur gab nur eine etwa 3-proz. Ausb. an *Z*-Peptid. Mit *Z-Gly·p*-nitrophenylester wurde in siedendem Eisessig eine Ausb. von 67% d. Th. nach 10 Min. (Rückfluß) erhalten.

4. *Z-Gly·L-Leu·OH*: 9.03 g *Z-Gly·SC₆H₅* und 3.93 g *L-Leucin* lieferten durch 2stdg. Erhitzen in 50 ccm sied. Eisessig nach Umkrist. aus Essigester/Petroläther 8.32 g (86% d. Th.) *Z-Gly·L-Leu·OH*, Schmp. 130—133° (Sintern ab 124°), $[\alpha]_D^{25}$: -17.0° ($c = 2.54$, in 1 *n* NaOH) (Lit.: Schmp. 104°, $[\alpha]_D^{25}$: -17.7°, in 1 *n* NaOH⁴⁰⁾, Schmp. 141—142°⁴¹⁾). 0.37 g (9%) *L-Leucin* und 0.42 g (5%) *Z-Gly·SC₆H₅* wurden zurückgewonnen.

5. *Z-Gly·L-Pro·OH*: 3.0 g *Z-Gly·SC₆H₅* und 1.15 g *L-Prolin* wurden in 15 ccm Eisessig 90 Min. unter Rückfluß erhitzt. Aus Essigester/Petroläther 1.6 g (55% d. Th.), Schmp. 150 bis 151° (Lit.: 156°, korr.⁴²⁾, 155°⁴³⁾), $[\alpha]_D^{25}$: -60.4° ($c = 2.5$, in absol. Äthanol). 0.59 g *Z-Gly·SC₆H₅* wurden zurückgewonnen.

6. *Z-Gly·L-Meth·OH*: 3.0 g *Z-Gly·SC₆H₅* und 1.49 g *L-Methionin* wurden 2 Stdn. unter Rückfluß in 15 ccm siedendem Eisessig erhitzt. Das *Z*-Peptid kristallisierte beim Ansäuern der Natriumhydrogencarbonatlösung aus. Aus Essigester/Petroläther 2.65 g (78% d. Th.), Schmp. 110—111°, $[\alpha]_D^{25}$: +4.2° ($c = 2.4$, in absol. Äthanol) (Lit.⁴⁴⁾: 110—111°).

Mit Trifluoressigsäure wurde das *Z*-Peptid in Glycyl-*L*-methionin übergeführt, Schmp. 184—186° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: -10.3° ($c = 2.82$, in Wasser) (Lit.⁴⁵⁾: $[\alpha]_D^{25}$: -10.2° (H₂O)).

7. *Z-Gly·L-Phe·OH*: 3.0 g *Z-Gly·SC₆H₅* und 1.65 g *L-Phenylalanin**) wurden mit 3 ccm Eisessig 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Beim Einengen des Essigesterextraktes fielen Kri-

*) Das verwendete *L*-Phenylalanin war optisch nicht rein und zeigte nur eine Drehung -31.9° statt -35.1°.

34) E. P. CROMMERS und J. F. ARENS, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **78**, 558 [1959].

35) M. BERGMANN und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **117**, 189 [1937].

36) J. R. VAUGHAN JR. und R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **74**, 676 [1952].

37) R. KUHN und H. W. RUELIUS, Chem. Ber. **85**, 38 [1952].

38) Th. WIELAND und R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. **569**, 122 [1950].

39) St. GOLDSCHMIDT und M. WICK, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 [1952].

40) St. GOLDSCHMIDT und H. LAUTENSCHLAGER, Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 [1953].

41) A. M. STAHHANN, J. S. FRUTON und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **164**, 753 [1946].

42) M. BERGMANN, L. ZERVAS, H. SCHLEICH und F. LEINERT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **212**, 78 [1932].

43) H. N. RYDON und P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3642.

44) C. A. DEKKER, S. P. TAYLOR und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **180**, 155 [1949].

45) K. R. RAO, S. M. BIRNBAUM, R. B. KINGSLEY und J. P. GREENSTEIN, J. biol. Chemistry **198**, 507 [1952].

stalle aus, die beim Erwärmen nicht wieder in Lösung gingen: 0.144 g, Schmp. 158—159° (Sintern 151°) (Lit.: *Z·Gly·DL-Phe·OH* 156—157°, 159.5—160°^{7,46)}, 161°³⁰⁾, 162°⁴⁷⁾). Nach Zugabe von Petroläther kristallisierte das *Z-Peptid* aus: 2.61 g (76.5%), Schmp. 120—123° (Sintern 118°), $[\alpha]_D^{25}$: +35.5° ($c = 2.63$, in Äthanol).

Die Hauptmenge wurde nochmals fraktioniert:

- a) in heißem Essigester schwer löslich: 2.5 %, Schmp. 156—158°,
- b) 72 %, Schmp. 121—124°, $[\alpha]_D^{25}$: +35.0° ($c = 2.69$, in absol. Äthanol),
- c) 14 %, Schmp. 125—126°, $[\alpha]_D^{25}$: +40.8° ($c = 1.47$, in absol. Äthanol).

Lit.^{6,46,48)}: Schmp. 126°, 125—126°, $[\alpha]_D$: +36 bis +41.9° in Äthanol.

8. *Z·Gly·L-Try·OH*: 1.65 g *Z·Gly·OC₆H₄NO₂(p)* und 1.0 g *L-Tryptophan* wurden in 5 ccm Eisessig 2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Natriumhydrogencarbonatlösung wurde zunächst mit konz. Salzsäure neutralisiert und dann mit Eisessig auf p_H 3—4 gebracht. Das ausgefallene *Z·Gly·L-Try·OH* kristallisierte nach dem Animpfen: 1.1 g (56 % d. Th.), Schmp. 135°, aus Essigester/Petroläther umkrist.: Schmp. 141—142° (Lit.⁴⁹⁾: 142°), $[\alpha]_D^{25}$: +33.3° ($c = 2.34$, in absol. Äthanol).

9. *Z·Gly·O-Benzyl-DL-Ser·OH*: 3.0 g *Z·Gly·SC₆H₅* und 0.975 g *O-Benzyl-L-serin**) oder die DL-Verbindung (2:1 Mol.) wurden in 20 ccm Eisessig 1½ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Aus Essigester 0.94 g (50 % d. Th.), Schmp. 137—137.5° (Lit.⁵⁰⁾: 136°), optisch inaktiv.

$C_{20}H_{22}N_2O_6$ (386.4) Ber. C 62.15 H 5.74 N 7.25 Gef. C 61.84 H 5.82 N 7.14

10. *Z·L-Ala·Gly·OH*: 18.9 g *Z·L-Ala·SC₆H₅***) und 4.5 g *Glycin* wurden in 100 ccm Eisessig 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Aus Essigester/Petroläther 13.3 g (82 % d. Th.), Schmp. 127—128°, $[\alpha]_D^{25}$: -17.0° ($c = 2.65$, in absol. Äthanol) (Lit.^{51,52,53)}: Schmp. 130°, 132°, $[\alpha]_D^{25}$: -17.4°, $c = 5$, in Äthanol)⁵³⁾.

In einem weiteren Versuch wurde unter Zusatz der 0.17 mol. Menge wasserfreien Natriumacetats erhitzt. Ausb. 76 % d. Th., Schmp. 127—128°, $[\alpha]_D^{25}$: -17.8° ($c = 2.48$, in absol. Äthanol).

11. *Z·L-Ala·L-Val·OH*: 9.45 g *Z·L-Ala·SC₆H₅* und 3.5 g *L-Valin* wurden in 50 ccm Eisessig 5 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Auf Zusatz von Petroläther zum eingedampften Essigesterextrakt fiel ein Öl aus, das über Nacht kristallisierte. Rohausb. 7.33 g (76 % d. Th.), Schmp. 122—125° (Sintern ab 105°), aus Essigester/Petroläther Schmp. 121—124°, $[\alpha]_D^{25}$: -12.8° ($c = 3.6$, in absol. Äthanol).

Die bei verschiedener Erhitzungsdauer erhaltenen Ausbeuten zeigt folgende Tabelle:

Zeit (Min.)	40	120	180	300
Ausb. % d. Th.	35	60	70	76
Ausb. %, unter Berücksichtigung des zurückgewonnenen Esters.	51	64	76	—

*) Herrn Dr. E. WÜNSCH danken wir für die Überlassung dieser Verbindung.

**) nach l. c.²⁴⁾ hergestellt: Schmp. 84.5°, $[\alpha]_D^{25}$: -39.4° ($c = 2.06$ in Äthanol).

46) H. NEURATH und E. ELKINS-KAUFMAN, J. biol. Chemistry **170**, 221 [1947].

47) G. W. KENNER und R. J. STEDMAN, J. chem. Soc. [London] **1952**, 2069.

48) K. HOFMANN und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **134**, 225 [1940].

49) E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **175**, 39 [1948].

50) W. GRASSMANN, E. WÜNSCH, P. DEUFEL und M. ZWICK, Chem. Ber. **91**, 538 [1958].

51) G. F. HOLLAND und L. A. COHEN, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3768 [1958].

52) W. H. STEIN, S. MOORE und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry **154**, 191 [1954].

53) W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. **91**, 449 [1958].

H·L-Ala·L-Val·OH, mit Trifluoressigsäure erhalten (61 % d. Th.): $[\alpha]_D^{25}$: -6.5° ($c = 4.4$, in Wasser) (Lit.⁵⁴): $[\alpha]_D^{25}$: -5.9° , $c = 10$, in Wasser).

12. *Z·L-Leu·Gly·OH*: 1.95 g *Z·L-Leu·SC₆H₅*²⁴) und 0.5 g *Glycin* (1 : 1.2 Moll.) wurden in 3 ccm Eisessig 250 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Umkrist. aus Essigester/Petroläther 1.37 g (77 % d. Th.), Schmp. 112–113° (Lit.^{55,6}): 115°, 118°), $[\alpha]_D^{25}$: -23.7° ($c = 2.87$, in absol. Äthanol).

In einem weiteren Versuch wurde die 0.33 mol. Menge wasserfreies Natriumacetat zugesetzt. Ausb. nach 60 Min. 57 % d. Th., Schmp. 112–114°, $[\alpha]_D^{25}$: -23.8° ($c = 2.43$, in absol. Äthanol). Ausb. nach 90 Min. 71 % d. Th. (92 % unter Berücksichtigung des zurückgewonnenen Esters).

13. *Z·L-Leu·L-Ala·OH*: 1.43 g *Z·L-Leu·SC₆H₅* und 0.36 g *L-Alanin* (1 : 1.6 Moll.) wurden in 3 ccm Eisessig 11.5 Stdn. im 130° warmen Ölbad erhitzt: Lange Nadeln aus Essigester/Petroläther, Ausb. 0.58 g (43 % d. Th.), Schmp. 150°, $[\alpha]_D^{25}$: -24.6° ($c = 2.8$ in absol. Äthanol). Aus Äthanol/Wasser Schmp. 151–152° (Lit.^{56,57}): 152–153°, 150–155°), $[\alpha]_D^{25}$: -25° , $[\alpha]_D^{35}$: -23.8° (in Äthanol).

Die Ausbeute betrug nach 15 Min. Erhitzen 4 %, nach 2 Stdn. 36 % und nach 10 Stdn. 41 % d. Th.

14. *Z·L-Phe·Gly·OH*: 11.7 g *Z·L-Phe·SC₆H₅*^{*}) und 4.5 g *Glycin* (1 : 2 Moll.) wurden in 60 ccm Eisessig 90 Min. unter Rückfluß erhitzt. Ausb. 9.15 g (85 % d. Th.), Schmp. 147–148°, $[\alpha]_D^{27}$: 8.58° ($c = 2.45$, in Eisessig). 1. Frakt. aus Essigester, Schmp. 149–150°, $[\alpha]_D^{27}$: -10.1° , $[\alpha]_{546}^{27}$: -11.8° ($c = 2.54$, in Eisessig), 2. Frakt. Schmp. 148°, $[\alpha]_D^{28}$: -10.3° , $[\alpha]_{546}^{28}$: -12.1° ($c = 2.73$, in Eisessig) (Lit.⁶): Schmp. 154°, $[\alpha]_D^{28}$: -10.2° in Eisessig).

Zur Abspaltung des Z-Restes wurden 3.8 g *Z·L-Phe·Gly·OH* in 10 ccm Trifluoressigsäure unter Zusatz von 2 ccm Anisol 20 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdestillieren der Trifluoressigsäure i. Vak. wurde der Rückstand zwischen Wasser und Dibutyläther verteilt. Hierbei kristallisierte unumgesetztes *Z·L-Phe·Gly·OH* aus. Die wäßr. Phase wurde durch eine Säule von Amberlite IR 4B gegeben und das neutrale Eluat i. Vak. eingedampft. Bei der Zugabe von Äthanol kristallisierte das Peptid aus. Ausb. 1.4 g (59 % d. Th.), $[\alpha]_D^{27}$: $+103^\circ$, $[\alpha]_{546}^{27}$: $+122.0^\circ$ ($c = 2.5$, in Eisessig) (Lit.^{6,58}): $[\alpha]_D^{27}$: $+100.4^\circ$, in wäßr. Aceton, $[\alpha]_D^{28}$: $+99.6^\circ$, in Wasser).

15. *Z·L-Asp(β-OCH₃)·Gly·OH*: 4.0 g *Z·L-Asp(β-OCH₃)·OC₆H₄NO₂(p)*^{*}) und 0.75 g *Glycin* in 10 ccm Eisessig wurden 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Aus Essigester/Petroläther 1.81 g (54 % d. Th.), Schmp. 119–120°, zur Analyse aus Essigester umkrist. Schmp. 122°, $[\alpha]_D^{27}$: -17.2° ($c = 2.79$, in Äthanol).

C₁₅H₁₈N₂O₇ (338.3) Ber. C 53.25 H 5.36 N 8.28 Gef. C 53.64 H 5.54 N 8.25

Carbobenzoxy-tripeptide und höhere Peptide

16. *Z·Gly·Gly·Gly·OH*: 16 g *Z·Gly·SC₆H₅* und 7.0 g *Diglycin* wurden in 100 ccm Eisessig 90 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Ansäuern der Natriumhydrogencarbonatlsg. kristallisierte das Z-Tripeptid aus und wurde nach dem Absaugen gut mit kaltem Wasser gewaschen. Ausb. 13.0 g (76 % d. Th.), Schmp. 184–186° (Zers.) (Lit.^{55,39}): 196°, 198°).

* Nach I. c.²⁴) dargestellt, Ausb. 77 % d. Th., Schmp. 115–116°, $[\alpha]_D^{26}$: -57.0° , $[\alpha]_{546}^{26}$: -68.3° ($c = 2.4$, in Eisessig).

** von den FARBERWERKEN HOECHST erhalten.

⁵⁴) E. FISCHER und H. SCHEIBLER, Liebigs Ann. Chem. **363**, 136 [1908].

⁵⁵) M. BERGMANN, L. ZERVAS und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **111**, 225 [1935].

⁵⁶) W. J. POLGLASE und E. L. SMITH, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3081 [1949].

⁵⁷) J. R. VAUGHAN und J. A. EICHLER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2474 [1954].

⁵⁸) H. SCHWARZ und K. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5691 [1959].

17. *Z·Gly·Gly·L-Leu·OH*: 3.0 g *Z·Gly·SC₆H₅* und 1.1 g *H·Gly·L-Leu·OH* wurden in 15 ccm Eisessig 3 Stdn. im 130° warmen Ölbad erhitzt. Ausb. nach Krist. aus Essigester/Petroläther 1.92 g (87.5% d. Th.), Schmp. 142–144°, $[\alpha]_D^{25}$: +1.6° ($c = 2.16$, in absol. Äthanol), aus Wasser Schmp. 146–148°.

$C_{18}H_{25}N_3O_6$ (379.4) Ber. C 56.98 H 6.64 N 11.08 Gef. C 57.07 H 6.86 N 11.36

Nach 90 Min. Erhitzungsdauer erzielte man 78% d. Th. Ausb.

Nach Abspaltung des Z-Restes mit Trifluoressigsäure wurde das *H·Gly·Gly·L-Leu·OH* mit dem Schmp. 195–198° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: –28.1° ($c = 2.53$, in Wasser) erhalten (Lit.^{59,60}): $[\alpha]_D^{25}$: –28.0°, $[\alpha]_D^{19}$: –29.9°, $c = 2$, in Wasser).

18. *Z·Gly·L-Leu·Gly·OH*: 2.34 g *Z·Gly·L-Leu·SC₆H₅* *) und 0.85 g *Glycin* (1:2 Moll.) wurden in 10 ccm Eisessig 2 Stdn. im 130° warmen Ölbad erhitzt. Ausb. 1.46 g (68% d. Th.), ölig. Die Verbindung wurde mit Trifluoressigsäure in das freie Peptid übergeführt (Ausb. 44% d. Th.), $[\alpha]_D^{25}$: –43.8° ($c = 2.67$, in Wasser) (Lit.^{55,61,62}): –41.2 bis –43.3° in Wasser).

19. *Z·L-Ala·Gly·Gly·OH*

a) 8.58 g *Z·L-Ala·Gly·SC₆H₅* und 3.0 g *Glycin* (1:2 Moll.) wurden in 40 ccm Eisessig 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Das Z-Peptid kristallisierte aus der angesäuerten Natriumhydrogencarbonatlsg. beim Reiben mit einem Glasstab aus. Ausb. 5.55 g, Schmp. 157–158°, $[\alpha]_D^{25}$: –4.55° ($c = 2.64$, in absol. Äthanol), aus Wasser Nadeln, Schmp. 161–163°, $[\alpha]_D^{25}$: –6.1° ($c = 2.4$, in absol. Äthanol). Aus der Mutterlauge konnten durch zweimaliges Ausschütteln mit Essigester noch 1.03 g vom Schmp. 152–153° erhalten werden; Gesamtausb. 6.58 g (84% d. Th.).

$C_{15}H_{19}N_3O_6$ (337.3) Ber. C 53.40 H 5.68 N 12.46 Gef. C 53.40 H 5.84 N 12.45

b) 9.45 g *Z·L-Ala·SC₆H₅* und 3.93 g *Glycyl-glycin* wurden in 50 ccm Eisessig 1½ Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Ausb. 4.51 g aus der angesäuerten Natriumhydrogencarbonatlsg., Schmp. 155–157°, aus der Mutterlauge noch 0.57 g, Schmp. 154–155°, Gesamtausb. 50% d. Th.

20. *Z·Gly·L-Ala-L-Phe·Gly·OH*: 3.72 g *Z·Gly·L-Ala·SC₆H₅* und 1.11 g *H·L-Phe·Gly·OH* wurden in 20 ccm Eisessig 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Beim Aufarbeiten mit Natriumhydrogencarbonatlsg. und Essigester blieben 0.51 g (50% d. Th.) Phenylalanyl-glycinanhydrid, Schmp. 255–256° (Subl.) ungelöst zurück. Ausb. an Z-Tetrapeptid 0.416 g (17.2% d. Th.), Schmp. 169–172°, $[\alpha]_D^{25}$: –24.5° ($c = 2.37$, in Glykolmonomethyläther). Aus Methanol farblose Nadeln, Schmp. 174–175°, $[\alpha]_D^{25}$: –31.9°, $[\alpha]_{446}^{25}$: –36.8° ($c = 2.6$, in Glykolmonomethyläther) (Lit.^{6,9}): Schmp. 175°, $[\alpha]_D^{25}$: –31.7°, $c = 2.5$, in Glykolmonomethyläther).

$C_{24}H_{28}N_4O_7$ (484.5) Ber. C 59.49 H 5.83 N 11.56 Gef. C 59.26 H 5.78 N 11.36

21. *Z·L-Ala·Gly·Gly·L-Leu·OH*

a) 1.42 g *Z·L-Ala·SC₆H₅* und 0.55 g *H·Gly·Gly·L-Leu·OH* (2:1 Moll.) wurden in 5 ccm Eisessig 90 Min. im 130° warmen Ölbad erhitzt. Das Tripeptid ging sofort in Lösung. Aus Essigester/Petroläther zunächst als Sirup, der allmählich kristallisierte. Ausb. 0.693 g (68% d. Th.), Schmp. 120–122° (Sintern ab 108°). Das Z-Tetrapeptid kristallisierte sofort auf Zusatz von etwas Wasser. Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert: Schmp. 122–123°, $[\alpha]_D^{25}$: –18.2° ($c = 2.25$, in absol. Äthanol).

$C_{21}H_{28}N_4O_6 \cdot H_2O$ (468.5) Ber. C 53.84 H 6.89 N 11.96 Gef. C 53.90 H 6.99 N 11.78

*) Sirupös, $[\alpha]_D^{25}$: –81.6° ($c = 2.93$, in absol. Äthanol), nach l. c.²⁴) dargestellt.

⁵⁹) J. S. FRUTON, V. A. SMITH und P. E. DRISCOLL, J. biol. Chemistry **173**, 457 [1948].

⁶⁰) P. C. CROFTS, J. H. H. MARKES und H. N. RYDON, J. chem. Soc. [London] **1959**, 3610.

⁶¹) S. SIMMONDS, J. I. HARRIS und J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **188**, 251 [1951].

⁶²) F. C. MCKAY und N. F. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4686 [1957].

b) 1.28 g *Z*-L-Ala·Gly·Gly·SC₆H₅ und 0.786 g *L*-Leucin (1:2 Moll.) wurden 70 Min. in 10 ccm Eisessig im 130° warmen Ölbad erhitzt. Aus Wasser umkrist. 0.85 g (61% d. Th.), Schmp. 123–124°, $[\alpha]_D^{25}$: –18.0° (*c* = 2, in absol. Äthanol), Misch-Schmp. mit der nach a) erhaltenen Verb. ohne Erniedrigung.

22. *Z*-L-Phe·Gly·L-Ala·L-Val·OH: 1.34 g *Z*-L-Phe·Gly·SC₆H₅ und 1.12 g *H*-L-Ala·L-Val·OH (1:2 Moll.) wurden 1 Stde. in 20 ccm Eisessig im 130° warmen Ölbad erhitzt. Beim Aufnehmen in Natriumhydrogencarbonatlsg. und Essigester hinterblieb wenig Alanyl-valinanhydrid ungelöst. Aus Essigester/Petroläther 1.33 g (85% d. Th.), Schmp. 178–180° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: –18.6° (*c* = 2.37, in Äthanol), nach Umkrist. aus Essigester Schmp. 193–195°, $[\alpha]_D^{25}$: –18.6°, $[\alpha]_{546}^{25}$: –22.6° (*c* = 2.3, in Äthanol).

Wurde die Kondensation im Molverhältnis 1:1 vorgenommen, so betrug die Ausb. 64% d. Th.

C₂₇H₃₄N₄O₇ (526.6) Ber. C 61.58 H 6.51 N 10.64 Gef. C 61.79 H 6.60 N 10.79

23. *Z*-L-Ala·Gly·Gly·L-Leu·Gly·OH: 4.29 g *Z*-L-Ala·Gly·Gly·SC₆H₅ und 1.88 g *H*-L-Leu·Gly·OH wurden in 20 ccm Eisessig 90 Min. auf 120° erhitzt. Das nach dem Ansäuern der Natriumhydrogencarbonatlsg. ausgefallene *Z*-Pentapeptid löste sich in einer handlichen Menge Essigester nur z. Teil. Der ungelöste Teil betrug 2.23 g, Schmp. 199–200°. Die Essigesterlsg. wurde mit Natriumhydrogencarbonatlsg. ausgezogen. Beim Ansäuern fielen noch 0.7 g *Z*-Pentapeptid aus, Schmp. 196–197°. Gesamtausb. 2.93 g (58% d. Th.). (Der Essigester enthielt noch eine geringe Menge Leucyl-glycinanhydrid, Schmp. 210–212°), $[\alpha]_D^{25}$: –11.8°, $[\alpha]_{546}^{25}$: –14.4°, (*c* = 2.37, in Dimethylformamid).

C₂₃H₃₃N₅O₈ (507.5) Ber. C 54.43 H 6.67 N 13.80 Gef. C 54.16 H 6.55 N 13.73

24. *Z*-Hexaglycin: 4.15 g *Z*-Gly·Gly·Gly·SC₆H₅ und 2.84 g Triglycin (1:1.5 Moll.) wurden in 25 ccm Eisessig 2 Stdn. im 120° warmen Ölbad erhitzt. Dabei fiel das entstehende *Z*-Hexaglycin aus und bildete schließlich einen dicken Brei. Es wurde abgesaugt, mit 45 ccm Wasser erhitzt und heiß abgesaugt, mit Wasser und Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausb. 4.3 g (87% d. Th.), Schmp. 267–270° (Zers.). Es ist unlöslich in den meisten Lösungsmitteln, sehr schwer löslich in Dimethylformamid und Wasser. Zur Analyse kam das über P₂O₅ getrocknete Rohprodukt.

C₂₀H₂₆N₆O₉ (494.5) Ber. C 48.58 H 5.30 N 16.53 Gef. C 48.30 H 5.59 N 17.00

25. *Z*-L-Ala·Gly·Gly·L-Ala·Gly·Gly·OH: 3.0 g *Z*-L-Ala·Gly·Gly·SC₆H₅ und 1.42 g *H*-L-Ala·Gly·Gly·OH wurden in 20 ccm Eisessig 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abddestillieren des Eisessigs und des Thiophenols i. Vak. wurde der Rückstand zwischen Essigester und Wasser unter schwachem Erwärmen verteilt. Er löste sich dabei völlig auf. Der beim Eindampfen der wäßrigen Phase i. Vak. hinterbleibende Rückstand kristallisierte beim Versetzen mit heißem Essigester. Nach dem Lösen der schwach bräunlichen Kristalle in Wasser wurde mit Aktivkohle und Dowex 50 H[®]-Form behandelt, bis die Ninhydrinreaktion fast negativ war. Die fast farblose Lösung wurde vom Ionenaustauscher abgetrennt und dieser mit Wasser mehrfach gewaschen. Beim Einengen i. Vak. kristallisierte das *Z*-Hexapeptid aus. Es wurde abgesaugt und von Wasser durch Gefriertrocknung befreit. Ausb. 1.77 g, Schmp. 157–160° (Sintern bei 148°).

Aus der Mutterlauge wurde noch eine zweite Fraktion durch Gefriertrocknung gewonnen: 0.795 g, Schmp. 148–152° (Sintern bei 110°). Gesamtausb. 2.56 g (67%). Die Essigesterlsg. enthielt noch etwa 0.35 g unumgesetztes *Z*-L-Ala·Gly·Gly·SC₆H₅.

Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert und gefriergetrocknet: Schmp. 161–163° (Sintern ab 117–118°, Wasserabgabe), $[\alpha]_D^{25}$: –4.6° (*c* = 2.4, in Dimethylformamid).

Rotationsdispersion: $[\alpha]$: –5.9° –6.7° –11.8° –15.7° –20.9°
 578 546 436 405 364

Das Z-Hexapeptid kristallisiert mit 1 Mol. Wasser, das sich auch durch Trocknen über P_2O_5 bei 70° nicht entfernen läßt.

$C_{22}H_{30}N_6O_9 \cdot H_2O$ (540.5) Ber. C 48.88 H 5.97 N 15.55 Gef. C 48.69 H 6.24 N 15.63

Carbobenzoxy-peptid-thiophenylester

26. Z·Gly·L-Leu·SC₆H₅: 3.22 g Z·Gly·L-Leu·OH und 1.2 ccm Thiophenol wurden in 50 ccm Tetrahydrofuran auf -30° gekühlt und mit 2.3 g DCCI in wenig Tetrahydrofuran versetzt. Sodann wurde 80 Min. bei -15° stehengelassen, der gebildete Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst, mit Wasser, 3-proz. Natriumhydrogencarbonatlg., 0.1 n HCl und nochmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ hinterblieb beim Eindampfen der Thiophenylester als Sirup; Ausb. 4.03 g.

Das aus dem so gewonnenen Z·Gly·L-Leu·SC₆H₅ mit Glycin in Eisessig nach 18. dargestellte Z·Gly·L-Leu·Gly·OH zeigte $[\alpha]_D^{25}$: -42.3° (c = 2.88, in Wasser).

27. Z·Gly·L-Ala·SC₆H₅: 4.1 g Z·Gly·L-Ala·OH und 1.8 g Thiophenol lieferten mit 3.34 g DCCI in 20 ccm Tetrahydrofuran + 5 ccm Dimethylformamid bei -15° 4.61 g (85% d. Th.) Thiophenylester, Schmp. 87-89°, aus Essigester/Petroläther umkrist. 3.85 g, Schmp. 88-89°, $[\alpha]_D^{25}$: -74°, $[\alpha]_{546}^{25}$: -91.0° (c = 2.6, in Äthanol).

$C_{18}H_{20}N_2O_4S$ (372.4) Ber. C 61.27 H 5.41 N 7.52 Gef. C 61.45 H 5.70 N 7.11

28. Z·L-Ala·Gly·SC₆H₅: 8.4 g Z·L-Ala·Gly·OH wurden in 60 ccm Tetrahydrofuran mit 3.6 ccm Thiophenol und 6.8 g DCCI bei -20° vereinigt. Nach 10stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur Ausb. 9.0 g (80% d. Th.), Nadeln aus Essigester/Petroläther, Schmp. 115-117°, $[\alpha]_D^{25}$: -36.9° (c = 3, in absol. Äthanol).

$C_{18}H_{20}N_2O_4S$ (372.4) Ber. C 61.27 H 5.41 N 7.52 Gef. C 61.53 H 5.56 N 7.68

29. Z·L-Leu·Gly·SC₆H₅: Analog der vorstehenden Verbindung wurde eine Ausb. von 46% d. Th. erhalten, Schmp. 128°, $[\alpha]_D^{25}$: -36.0° (c = 2.56, in absol. Äthanol).

$C_{22}H_{26}N_2O_4S$ (414.5) Ber. C 63.74 H 6.32 N 6.76 Gef. C 63.82 H 6.43 N 6.63

30. Z·L-Phe·Gly·SC₆H₅: 3.3 g Z·L-Phe·Gly·OH und 1.2 ccm Thiophenol wurden mit 2.22 g DCCI in 100 ccm Tetrahydrofuran zunächst bei -20°, dann bei 0° 24 Stdn. stehengelassen. Ausb. 3.7 g (89%), Schmp. 133-135° (aus Essigester/Petroläther), $[\alpha]_D^{30}$: -14.1°, $[\alpha]_{546}^{30}$: -17.0° (c = 2.7, in absol. Äthanol).

$C_{25}H_{24}N_2O_4S$ (448.5) Ber. C 66.95 H 5.39 N 6.25 Gef. C 66.57 H 5.63 N 5.99

31. Z·Gly·Gly·Gly·SC₆H₅: 11.0 g Z·Gly·Gly·Gly·OH wurden in 70 ccm Dimethylformamid und 30 ccm Tetrahydrofuran mit 4.1 ccm Thiophenol und 7.7 g DCCI bei -20° umgesetzt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur wurde der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, worauf die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde in 1.5 l Essigester warm gelöst, worauf mit Natriumhydrogencarbonatlg. und Wasser gewaschen wurde. Das Produkt kristallisierte beim Einengen aus. 11.4 g (81% d. Th.), Schmp. 132°. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert.

$C_{20}H_{21}N_3O_5S$ (415.5) Ber. C 57.82 H 5.10 N 10.12 Gef. C 57.62 H 4.96 N 9.84

32. Z·L-Ala·Gly·Gly·SC₆H₅: 3.37 g Z·L-Ala·Gly·Gly·OH, 1.3 ccm Thiophenol in 25 ccm Tetrahydrofuran, 25 ccm Essigester und 10 ccm Dimethylformamid wurden bei -25° mit 2.3 g DCCI versetzt. Nach mehrstündigem Verweilen im Eisschrank wurde aufgearbeitet. Schmp. 141-142° (aus Essigester/Petroläther), Ausb. 4.15 g (97% d. Th.), $[\alpha]_D^{25}$: +5.1° (c = 2.7, in Dimethylformamid). Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert.

$C_{21}H_{23}N_3O_5S$ (429.5) Ber. C 58.73 H 5.40 N 9.78 Gef. C 59.26 H 5.51 N 9.99

33. *Z*-L-Ala·Gly·Gly·L-Leu·Gly·SC₆H₅: 1.6 g *Z*-L-Ala·Gly·Gly·L-Leu·Gly·OH wurden mit 0.5 ccm Thiophenol und 0.72 g DCCI in 25 ccm Dimethylformamid bei -20° umgesetzt. Nach 1 Stde. wurde die Kühlung entfernt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Dimethylformamid wurde nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs i. Vak. verdampft. Beim Versetzen des Rückstandes mit heißem Essigester kristallisierte der Thiophenylester. Ausb. 1.75 g (93% d. Th.), Schmp. 197—200°, aus Äthanol Schmp. 201—202°, $[\alpha]_D^{25}$: -19.0°, $[\alpha]_{546}^{25}$: -23.5° ($c = 2.7$, in Dimethylformamid).

C₂₉H₃₇N₅O₇S (599.7) Ber. C 58.08 H 6.22 N 11.65 Gef. C 57.51 H 6.33 N 11.18

Carbobenzoxy-aminosäure-amide

A. Durch Schmelzen der *Z*-Aminosäure-thiophenylester mit Ammoniumacetat

34. *Z*-Gly·NH₂: 1 g *Z*-Gly·OC₆H₄NO₂(*p*)^{9,24} wurde mit 4.5 g Ammoniumacetat 2 Min. auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die klare Schmelze mit 25 ccm Wasser versetzt. Das auskristallisierte Amid wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 0.51 g (81% d. Th.), Schmp. 135—136°, Schmp. 138—139° (aus Essigester) (Lit.⁷⁾: 135°).

C₁₀H₁₂N₂O₃ (208.2) Ber. C 57.68 H 5.80 N 13.45 Gef. C 57.74 H 5.82 N 13.54

35a) *Z*-L-Leu·NH₂: 1.0 g *Z*-L-Leu·SC₆H₅ wurden mit 4 g Ammoniumacetat 8 Min. auf 125° erhitzt. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 0.58 g (78.5% d. Th.), Schmp. 122—123°, $[\alpha]_D^{25}$: -12.2° ($c = 2.54$ in Äthanol). Aus Äthanol/Wasser, Schmp. 124—125°.

C₁₄H₂₀N₂O₃ (264.3) Ber. C 63.61 H 7.63 N 10.60 Gef. C 63.62 H 7.72 N 10.13

B. Durch Erhitzen der *Z*-Aminosäure-thiophenylester mit Aminen in Eisessig

35b) *Z*-L-Leu·NH₂: 1.43 g *Z*-L-Leu·SC₆H₅ und 0.62 g Ammoniumacetat (1:8 Moll.) wurden in 10 ccm Eisessig 2 Stdn. im 130° warmen Ölbad erhitzt. Nach Eindampfen i. Vak. wurde der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die Essigesterphase wurde mit Natriumhydrogencarbonatlsg. und Wasser gewaschen. Nach Abdestillieren wurde mit 40 ccm Diisopropyläther erwärmt, wobei das Amid kristallisierte. Ausb. 0.59 g (56% d. Th.), Schmp. und Misch-Schmp. mit der nach 35a) hergestellten Verbindung bei 123—124°.

36. *Z*-Glycin-piperidid: 0.90 g *Z*-Gly·SC₆H₅ wurden in 5 ccm Eisessig mit 0.3 g Piperidin 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach Aufarbeitung wie bei 35b) Ausb. 0.57 g (69% d. Th.), Schmp. 109—110°.

C₁₅H₂₀N₂O₃ (276.3) Ber. C 65.20 H 7.30 N 10.14 Gef. C 65.34 H 7.51 N 9.90

37. *Z*-L-Leucin-isoamylamid: 1.1 g *Z*-L-Leu·SC₆H₅ und 0.42 g Isoamylamin (1:1.6 Moll.) wurden in 2 ccm Eisessig 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Aus Essigester/Petroläther und aus Diisopropyläther umkrist. 0.36 g (36% d. Th.) glänzende Blättchen, Schmp. 94°.

Die gleiche Verbindung wurde in 57-proz. Ausb. erhalten, als 3.58 g *Z*-L-Leu·SC₆H₅ und 1.3 g *L*-Leucin 20 Sek. über freier Flamme auf etwa 220° erhitzt wurden: Schmp. 94°, $[\alpha]_D^{25}$: -18.8° ($c = 2.23$, in Äthanol).

C₁₉H₃₀N₂O₃ (334.4) Ber. C 68.24 H 9.24 N 8.37 Gef. C 68.47 H 9.25 N 8.59

Carbobenzoxy-peptide durch Schmelzen von *Z*-Aminosäure-thiophenylestern mit Aminosäuren

38. *Z*-L-Ala·L-Val·OH: 3.15 g *Z*-L-Ala·SC₆H₅ und 1.17 g *L*-Valin wurden vermischt und in ein auf 170° vorgeheiztes Ölbad gebracht, worauf weiter erhitzt wurde. Die Thiophenolentwicklung begann bei 190°, die Hauptreaktion erfolgte zwischen 200 und 210°. Nach 5 Min. langem Erhitzen auf 210° wurde abgekühlt, die Schmelze in Essigester aufgenommen

und vom unumgesetzten Valin (0.41 g = 35% d. Th.) abgetrennt. Durch Ausziehen mit Natriumhydrogencarbonatlsg. und Ansäuern wurden 1.71 g (53% d. Th.) Z-Peptid erhalten.

Mit HBr/Eisessig wurden daraus 55% *H·L-Ala·L·Val·OH*, nach Umkrist. aus Wasser/Äthanol $[\alpha]_D^{25}$: -6.6° ($c = 4.8$, in Wasser) erhalten. Lit. s. unter 11.

39. *Z·L-Leu·Gly·OH*: Analog dem voranstehenden Beispiel dargestellt durch 30 Min. langes Erhitzen auf 190–210°. Ausb. nach Umkrist. aus Essigester/Petroläther 11% d. Th., Schmp. 112–113°, $[\alpha]_D^{25}$: -23.7° ($c = 1.9$, in Äthanol); vgl. unter 12.

40. *Z·Gly·DL-Ala·Gly·OH*: 1.33 g *Z·Gly·SC₆H₅* wurden mit 0.58 g *H·DL-Ala·Gly·OH* 35 Sek. über freier Flamme erhitzt. Ausb. 0.77 g (57% d. Th.), Schmp. 143°, aus wenig Wasser umkrist.: 150.5–151° (Lit.^{38,39}): 145°).

$C_{15}H_{19}N_3O_6$ (337.3) Ber. C 53.41 H 5.68 N 12.46 Gef. C 53.55 H 5.73 N 12.43

Eine Probe wurde mit Trifluoressigsäure in das freie Peptid übergeführt (84% d. Th.), Schmp. 220–221° (Zers.), papierchromatographisch einheitlich.

Kinetische Messungen

A. *Bildung von Z-Peptiden*: 3 bzw. 5 mMol Z-Aminosäure-thiophenylester und die äquivalente Menge Aminosäure wurden in einem Zweihalskolben mit Rückflußkühler mit 20 ccm Eisessig (p.a. Merck) versetzt. Der Ansatz wurde in einem 100 bzw. 130° warmen Thermostaten (Öl) bis zur vollständigen Lösung der Aminosäure kräftig geschüttelt; im 130° warmen Ölbad siedete er gelind (Innentemperatur 118°). Jeweils 0.5 ccm der sofort nach der Entnahme abgekühlten Probe wurden mit 0.005 *n* J₂ in Eisessig und 10 ccm Wasser versetzt. Nach 1 Min. wurde das unverbrauchte Jod mit 0.005 *n* Natriumthiosulfat zurücktitriert.

Beispiele bei 118° (Auswahl)

Zeit (Min.)	Entstandenes Thiophenol, % d. Th.					
	<i>Z·Gly· L-Ala·OH</i>	<i>Z·Gly· L-Pro·OH</i>	<i>Z·Gly· L-Phe·OH</i>	<i>Z·L-Ala· Gly·OH</i>	<i>Z·L-Ala· L-Ala·OH</i>	<i>Z·L-Pro· Gly·OH</i>
5	12.6	12.8	14.4	—	—	—
10	28.1	17.6	27.6	22.0	5.6	7.3
15	38.6	22.8	39.6	—	—	—
20	47.2	29.7	46.8	32.6	12.0	13.3
25	49.2	32.4	50.8	—	—	—
30	57.0	36.0	56.5	42.0	16.8	16.7
40	61.5	44.0	62.8	52.0	—	—
50	65.2	47.2	65.0	58.0	27.2	—
60	68.3	52.8	68.8	61.2	30.0	28.4
						(65 Min.)
80	71.9	58.4	72.4	66.0	37.6	34.0
100	75.8	63.5	73.2	71.3	44.2	36.0
120	—	—	75.6	72.6	48.4	40.6
130	—	70.8	—	—	—	—
140	—	—	—	74.5	—	43.4
150	—	72.0	—	—	54.4	—
200	—	—	—	76.0	—	45.4
						(196 Min.)
240	—	—	—	76.6	65.2	48.0
300	—	—	—	—	65.7	—
360	—	—	—	—	68.5	50.7

B. *Hydrolyse von Z-Glycin-thiophenylester*: 5 mMol in 20 ccm Eisessig (p. a. Merck) und 15 mMol Wasser bei 118°:

Zeit (Min.)	20	30	60	145	175	235	295	325
Thiophenol (% d. Th.)	2.4	2.8	7.2	14.9	17.6	21.6	28.4	30.0

C. *Acetylierung von Aminosäuren*: 2 g Aminosäure wurden in 40 ccm Eisessig (p. a. Merck) in einem Zweihalskölbchen mit Rückflußkühler in einem Thermostaten von 100 bzw. 130° erhitzt. Zur Bestimmung der gebildeten Acetylaminosäure wurden jeweils 5 ccm entnommen, der Eisessig wurde i. Vak. verdampft, der Rückstand dreimal mit Wasser versetzt und i. Vak. zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und dreimal mit siedendem absol. Alkohol ausgezogen. Nach dem Abfiltrieren der ungelösten Aminosäure wurde das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit 0.1 *n* NaOH titriert.

Zeit (Min.)	% Acetyl-glycin		% Acetyl-leucin		% Acetyl-prolin
	118°	100°	118°	100°	118°
35	10.5	—	7.3 (37 Min.)	—	—
60	18.3	2.9	—	3.1	5.8
90	—	—	19.9	—	—
120	33.4	6.0	—	5.2	11.1
155	—	—	30.4	—	—
180	44.8	—	—	—	15.6
210	—	—	38.8	—	—
240	55.8	12.6	—	—	—
270	—	—	49.7	—	—
300	64.4	—	—	10.5	—
335	—	—	—	—	25.4
420	73.5	—	—	—	—
510	—	—	68.1	—	—
540	83.3	—	—	—	—
580	—	—	—	—	43.4

Acetyl-leucin: Das nach 4stdg. Erhitzen von 2 g L-Leucin in sied. Eisessig durch Ausziehen mit sied. Äthanol nach dem Eindampfen erhaltene Acetyl-leucin (1.1 g) schmolz bei 150° (Sintern 142°), nach Umkrist. aus Wasser 0.53 g, Schmp. 162° (Sintern ab 142°), nochmals aus Wasser Schmp. 170—171°, $[\alpha]_D^{25}$: -22.5° ($c = 28$, in Methanol), Lit.^{63,64}: Schmp. für Acetyl-L-leucin 159—161°, für Acetyl-DL-leucin 185°, $[\alpha]_D^{25}$: -24.1° . BELL¹⁹) gibt an, durch 22stdg. Erhitzen vollständig racemisiertes Acetyl-leucin aus L-Leucin erhalten zu haben.

⁶³) S. M. BIRNBAUM, L. LEWINTOW, R. B. KINGSLEY und J. P. GREENSTEIN, J. biol. Chemistry **194**, 455 [1952].

⁶⁴) H. D. DE WITT und A. W. INGERSOLL, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3359 [1951].