

spitze nach anfänglichem Sintern mit scharfem Knall. Der Körper war jedoch durch Schlagen mit einem Hammer nicht zur Detonation zu bringen. Seine Handhabung in verdünnt wässriger Suspension schien demnach keineswegs gefährlich zu sein.

Am 4. April d.J. stand in einer unserer Kapellen ein Erlenmeyerkolben von 300 cm³, in welchem 5 Tage vorher eine Lösung von 0,2 Molen Nickelperchlorat in 150 cm³ Wasser mit 0,7 Molen Hydrazin versetzt worden war. Aus dieser Lösung sollte wiederum das Nickelhydrazinsulfat, diesmal in besonders grossen Kristallen, ausgefällt werden. Beim Stehen hatte sich aber der blaue Niederschlag gebildet, mit dem wir wohlvertraut zu sein glaubten. Um diesen wieder in Lösung zu bringen, wurden nochmals etwa 150 cm³ Wasser zugegeben, was den Kolben nahezu auffüllte, und nun ein Glasstab eingeführt, um den Niederschlag aufzurühren. Sobald dieser den Bodenkörper berührte, erfolgte eine Explosion mit grosser Brisanz, die den einen von uns (*B.M.*) schwer verstümmelt hat.

Dass ein Körper selbst in verdünnter Suspension beim blossem Berühren derart furchtbar reagiert, ist eine sehr seltene Erscheinung. Sie war nach den gemachten Erfahrungen besonders unerwartet. Der gefährliche Niederschlag sah nicht anders aus und war offenbar auch nicht besser kristallin als derjenige, den wir vorher in Händen hatten. Vielleicht ist aus der etwas konzentrierteren Lösung eine aktive Form des Stoffes mit starken Gitterstörungen ausgefallen. Auf alle Fälle zeigt die Erscheinung, dass die Perchlorate der Metallhydrazinkomplexe äusserst perfide Stoffe sind, die nur mit grosser Vorsicht gehabt werden sollten.

Zusammenfassung.

Selbst in verdünnter, wässriger Suspension zeigt Hydrazin-nickelperchlorat eine äusserst gefährliche Explosivität.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

253. Enzymatische Peptidsynthese.

2. Mitteilung¹⁾.

Isolierung von enzymatisch gebildetem L-Methionyl-L-methionin und L-Methionyl-L-methionyl-L-methionin ; Vergleich mit synthetischen Produkten.

von M. Brenner und R. W. Pfister.

(15. VIII. 51.)

Im Reaktionsgemisch von DL-Methionin-isopropylester, Wasser und Chymotrypsin bzw. Chymotrypsinkonzentraten ist papierchromatographisch das Vorliegen von Methionin-isopropylester, Methionin, Methionindipeptid und Methionin-tripeptid nachgewiesen worden¹⁾.

¹⁾ 1. Mitteilung: *M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, Helv. 33, 568 (1950).*

Der mit Äther extrahierbare, unveränderte Ester lieferte bei der Verseifung D-Methionin¹⁾ und aus den wasserlöslichen Anteilen ist L-Methionin isoliert worden¹⁾. Im folgenden wird nun die Isolierung der Peptide und ihr Vergleich mit den entsprechenden synthetisch hergestellten Produkten beschrieben.

Isolierung der Methioninpeptide

Zur Gewinnung definierter Produkte aus dem bei der Fermentreaktion (nasser Ansatz²⁾) anfallenden Methionin/Peptid-Gemisch schien es am einfachsten, zunächst zu carbobenzoxylieren und zu methylieren und hierauf an Aluminiumoxyd zu chromatographieren. Dabei wurde ohne Schwierigkeit ein Produkt erhalten, das sich nach Analyse, Mischprobe und Drehung als identisch mit Carbobenzoxy-L-methionyl-L-methionin-methylester³⁾ erwies (Tabelle 1). Das analoge Tripeptid-Derivat dagegen fiel nur in Spuren an. Wie sich später herausstellte, ist es selbst aus schwach aktivem Aluminiumoxyd nur schwer wieder eluierbar. Ferner zeigte sich, dass das Tripeptid unter den angewandten Bedingungen nur zu etwa 20 % carbobenzoxyliert wird⁴⁾.

Auf der Suche nach einer andern Auftrennungsmethode wurde das Substanzgemisch unter ständiger papierchromatographischer Kontrolle mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt. Dabei ergab sich, dass man es durch Auskochen mit Äthanol in eine unlösliche Methionin-Fraktion (rund 75 %) und eine in der Hitze lösliche, beim Erkalten aber auskristallisierende Peptid-Fraktion (rund 25 %) auftrennen kann. Das so erhaltene Peptid-Gemisch besteht aus einem in Wasser schwerer löslichen und einem leichter löslichen Anteil. Ersterer liefert beim Umkristallisieren aus Wasser analysenreines, konstant schmelzendes (Smp. 219—220°) und konstant drehendes ($[\alpha]_D^{16} = -70^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Wasser)) L-Methionyl-L-methionyl-L-methionin; Ausbeute 2,7 % bezogen auf das Methionin/Peptid-Gemisch.

Leider war ein direkter Vergleich mit synthetischem optisch aktivem Tripeptid nicht möglich, denn bisher blieben die Versuche zur Herstellung dieser Substanz aus synthetischem Cbz-L-methionyl-L-methionyl-L-methionin ohne Erfolg. Das aus dem Ferment-Reaktionsgemisch isolierte Tripeptid wurde daher in zwei Derivate, den Cbz-tripeptid-methylester und den Carboallyloxy-tripeptid-methylester, umgewandelt. Diese Derivate waren hinsichtlich Drehung, Schmelzpunkt und Mischprobe mit den entsprechenden aus L-Methionin synthetisierten Produkten identisch (Tab. 1).

¹⁾ M. Brenner & V. Kocher, Helv. 32, 333 (1949).

²⁾ 1. Mitteilung: M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, Helv. 33, 568 (1950).

³⁾ Carbobenzoxy- im folgenden abgekürzt: Cbz-.

⁴⁾ Carboallyloxychlorid reagiert etwa 4mal besser.

Vorversuche mit synthetischem L-Methionyl-L-methionin¹⁾ hatten gezeigt, dass dieses Dipeptid mit 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure²⁾ ein ausgezeichnet kristallisierendes, in kaltem Wasser ziemlich schwerlösliches Salz bildet. Die in Wasser leichter löslichen Anteile der Peptidfraktion wurden daher mit dieser Sulfonsäure behandelt. Das in einer Ausbeute von 40 %, bezogen auf die gesamte Peptidfraktion, anfallende Salz hat die Zusammensetzung $C_{10}H_{20}O_3N_2S_2$, $C_{10}H_7O_5NS$, H_2O ; seine übrigen Eigenschaften, die denjenigen des Produktes aus synthetischem Dipeptid entsprechen, finden sich in Tabelle 1. Die Zerlegung dieses Salzes liess sich leicht und fast quantitativ durch Filtration über eine Säule bewerkstelligen, die im oberen Teil aus Amberlite IR-4B, HCl und im untern Teil aus Amberlite IR-4B bestand³⁾. Das Dipeptid, das weder von der Harzbase noch von ihrem Hydrochlorid zurückgehalten wurde⁴⁾, konnte durch Einengen des Filtrates und Zusatz von Äthanol zur Kristallisation gebracht werden. Es entsprach in allen Eigenschaften dem synthetisch bereiteten L-Methionyl-L-methionin (Tab. 1).

Synthese der Vergleichspräparate.

L-Methionyl-L-methionin. Diese Verbindung ist kürzlich von Dekker et al. nach dem Azid-Verfahren hergestellt und beschrieben worden¹⁾. Eine sorgfältige Überarbeitung der Methodik (Azid-Kupplung, Abspaltung der Cbz-Gruppe), die im Hinblick auf die unten beschriebene Synthese des Tripeptids unternommen wurde, führte zu einer wesentlichen Erhöhung der Ausbeute (36 % statt 3,5 %, bezogen auf L-Methionin). Trotz dieser Verbesserung ist dieser Weg zur Herstellung grösserer Mengen des Dipeptids etwas mühsam. Es wurde deshalb auf die Fischer'sche Diketopiperazin-Methode⁵⁾ zurückgegriffen (Aminosäure-methylester \rightarrow Diketopiperazin \rightarrow Dipeptid). Dieses sonst seltener verwendete Verfahren ist hier gut brauchbar, weil einerseits die optisch aktiven Formen des Methionin-diketopiperazins durch HCl schneller gespalten werden als die Mesoform, und anderseits die grosse Kristallisationstendenz des 1-nitronaphthalin-5-sulfonsauren Salzes die Isolierung des Dipeptids erleichtert: L-Methionin-methylester liefert (40 Stunden bei 100° im Rohr) in wechselnder Ausbeute (65—71 %) schwach racemisiertes L-Methionin-diketopiperazin (Smp. 231—233°, $[\alpha]_D = -35^\circ$ bis -37° (c = 2 in Eis-

¹⁾ C. A. Dekker, S. P. Taylor & J. S. Fruton, J. Biol. Chem. **180**, 155 (1949).

²⁾ W. H. Stein & S. Moore, Biochemical Preparations I, John Wiley & Sons, New York 1949.

³⁾ Das Hydrochlorid des Austauschers besitzt eine 4mal grössere Kapazität für die Sulfonsäure als die Austauscherbase.

⁴⁾ Vgl. dazu M. Brenner & C. H. Burckhardt, Helv. **34**, 1070 (1951).

⁵⁾ Literaturzusammenstellung und Diskussion: J. S. Fruton, Adv. Protein Chem. **5**, 1 (1949); vgl. ferner H. F. Schott, J. B. Larkin, L. B. Rockland & M. S. Dunn, J. Org. Chem. **12**, 490 (1947).

essig)¹⁾), das ätherunlöslich und deshalb leicht isolierbar ist. Aus Präparaten mit einer Drehung bis hinab zu $[\alpha]_D = -25^\circ$ erhält man bei der Verseifung mit konz. Salzsäure (90 sek., 120°) optisch und chemisch reines Dipeptid. Die Ausbeute beträgt bei Verwendung von gutem Diketopiperazin ($[\alpha]_D = -37^\circ$) rund 60 %.

Kocht man das Diketopiperazin ($[\alpha]_D^{23} = -42^\circ$) mit alkoholischer Salzsäure, so resultiert bei anschliessender Behandlung mit 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure in 90-proz. Ausbeute das entsprechende Salz des L-Methionyl-L-methionin-äthylesters: $C_{12}H_{24}O_3N_2S_2$, $C_{10}H_7O_5NS$, Smp. 201—202°, $[\alpha]_D^{22} = +19,4^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Pyridin). Es lässt sich durch Verteilung zwischen Essigester und 1-n. Sodalösung leicht in seine Komponenten zerlegen. Der freie Dipeptidester ist ölig.

Derivate von L-Methionyl-L-methionyl-L-methionin.
a) Cbzo-L-methionyl-L-methionyl-L-methionin-methylester: Der Ester wurde durch Kupplung von Cbzo-L-methionin-azid mit L-Methionyl-L-methionin-äthylester (vgl. oben), anschliessende Verseifung und schliessliche Methylierung mit Diazomethan in rund 50-proz. Ausbeute erhalten. Schmelzpunkt und optische Drehung s. Tabelle 1.

Tabelle 1.

Vergleich von Derivaten aus enzymatisch und synthetisch bereitetem L-Methionin-dipeptid und L-Methionin-tripeptid.

| Substanz | enzymatisch | | synthetisch | | Misch-Smp. °C |
|--|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| | Smp. °C | $[\alpha]_D$ | Smp. °C | $[\alpha]_D$ | |
| Cbzo-L-methionyl-L-methionin-methylester | 98–99 | [−28 M] ³⁾ | 98–99 ²⁾ | [−27 M] | 98–99 |
| Cbzo-L-methionyl-L-methionin | 119–121 | [−18 M] | 118–120 ²⁾ | [−18 M] | 118–121 |
| L-Methionyl-L-methionin | 228–231 | [+25 W] | 229–231 ²⁾ | [+27 W] ²⁾ | 227–231 |
| L-Methionyl-L-methionin, 1-nitronaphthalin-5-sulfonsäure, H_2O | 98–103 | [+5 Mc] | 98–103 | [+5 Mc] | 98–103 |
| Cbzo-L-methionyl-L-methionyl-L-methionin-methylester . . . | 123–127 | [−38 M] | 124–128 | [−38 M] | 123–128 |
| Carboallyloxy-L-methionyl-L-methionyl-L-methionin-methyl-ester | 120–122 | [−40 M] | 121–123 | [−41 M] | 120–123 |

Die Behandlung des als Zwischenprodukt erhaltenen Cbzo-L-methionin-tripeptids mit Natrium in flüssigem Ammoniak führte zu einem Methionin-tripeptid (Papier-

¹⁾ Die höchste von uns beobachtete Drehung eines D-Methionin-diketopiperazin-präparates (D-Ester 40 Std. bei 75°) vom Smp. 232–234° betrug: $[\alpha]_D^{20} = +45,5^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Eisessig).

²⁾ C. A. Dekker et al., loc. cit.

³⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundete spez. Drehung für Na-Licht in folgenden Lösungsmitteln an: M = Methanol, W = Wasser, Mc = Methylcellosolve.

chromatogramm, Elementaranalyse), dessen wässrige Lösung bei Wellenlängen von $\lambda = 6563 \text{ \AA}$ bis $\lambda = 5461 \text{ \AA}$ keine optische Drehung aufwies. Dagegen blieb interessanterweise das Drehvermögen von enzymatisch gebildetem, freiem L-Methionin-tripeptid ($[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$) unter den Bedingungen der Na/NH_3 -Reduktion erhalten; der Verlust des Drehvermögens erfolgte also im obigen Fall vor oder während der Abspaltung des Cbzo-Restes.

Versuche zur Abspaltung des Cbzo-Restes mit Phosphoniumjodid zeigten im Falle des Dipeptidderivates, dass sowohl die Peptidbindung als auch die Thioäther-Gruppierung teilweise gespalten werden. Immerhin konnten wir dort in kleiner Ausbeute reines L-Methionyl-L-methionin isolieren. Im Falle des Tripeptidderivates versagte auch diese Methode, indem nur schwer trennbare Gemische erhalten wurden.

b) Carboallyloxy-L-methionyl-L-methionyl-L-methionin-methylester: Diese Verbindung wurde ausgehend von Carboallyloxy-L-methioninazid wie die entsprechende Cbzo-Verbindung erhalten. Schmelzpunkt und optische Drehung s. Tabelle 1.

Der eine von uns (M. B.) dankt der *Rockefeller Foundation* in New York für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert worden; Fehlergrenze $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Drehung und Analyse wurden, wo nicht anders vermerkt, 6 Stunden über P_2O_5 am Hochvakuum getrocknet (Badtemp. 50° unter dem Smp., höchstens aber 110°).

I. Isolierungen.

Gewinnung des Methionin/Peptid-Gemisches.

50 g frisch destillierter DL-Methionin-isopropylester werden in 1540 cm^3 Wasser gelöst (Ester-Konzentration = 0,17-m.) und 1,5 g dänisches Ferment¹⁾ zugesetzt. Man lässt die resultierende klare Lösung über Nacht bei 20° stehen, klärt das schwach trübe Reaktionsgemisch durch Filtration über Celite²⁾ und extrahiert das Filtrat zur Entfernung des unveränderten D-Methionin-isopropylesters während 20 Stunden im *Kutscher-Steddel*-Apparat mit Pentan vom Sdp. $32\text{--}34^\circ$ ³⁾. Eindampfen (40° , 15 mm Hg) der gegebenenfalls nochmals filtrierten wässrigen Lösung liefert rund 23 g kristallinen Rückstand = Methionin/Peptid-Gemisch.

L-Methionin-dipeptid und Derivate.

a) Cbzo-dipeptid-methylester: Ca. 4 g Methionin/Peptid-Gemisch in 200 cm^3 Wasser werden auf $0\text{--}2^\circ$ gekühlt und unter Rühren mit 12 cm^3 4-n. NaOH und 4,9 g Cbzo-chlorid versetzt. Man röhrt noch eine Stunde bei 0° , äthert die Reaktionsmischung 2 mal aus, säuert an (Kongo) und extrahiert 3 mal mit Essigester. Letzterer wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum bei 40° abgedampft. Es bleibt ein viskoses Öl zurück (6 g), aus dem beim Verdünnen mit etwa 4 Teilen Tetrachlorkohlenstoff Cbzo-DL-methionin (1,6 g, Smp. 110° , Mischsmp. mit Vergleichspräparat 111⁰) auskristallisiert. Nach Eindampfen der Mutterlauge (40° , 15 mm Hg) wird der Rückstand in 90 cm^3 Essigester aufgenommen, mit Diazomethan verestert und die Lösung mit 2-n. HCl, 1-n. Soda und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es bleiben 3,8 g eines Öles zurück, das, in 10 cm^3 Chloroform gelöst, durch eine Säule von 100 g Aluminiumoxyd (Aktivität IV⁴⁾) in Petroläther filtriert wird. Benzol/Äther 1:1 eluiert rund 400 mg einer

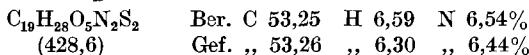
¹⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, loc. cit.

²⁾ Standard Super Cel, Celite Corp. (Schneider & Cie., Winterthur).

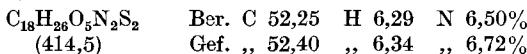
³⁾ Der Pentanextrakt kann auf D-Methionin verarbeitet werden.

⁴⁾ H. Brockmann & H. Schodder, B. 74, 73 (1941).

kristallisierenden Substanz, die nach Umlösen aus Aceton/Äther konstant bei 98—99° schmilzt, teilweise rekristallisiert und sich bei 104—105° endgültig verflüssigt. Die Mischprobe mit gleich schmelzendem synthetischem Cbzo-L-methionyl-L-methionin-methylester zeigt keine Depression. $[\alpha]_D^{17} = -26,5^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Methanol).



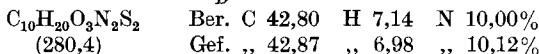
b) Cbzo-dipeptid: Durch Verseifung (Vorschrift vgl. Seite 2092/2993 des oben beschriebenen Methylesters erhalten. Reinigung durch Kristallisation aus Essigester/Petroläther: Smp. 121—122°; Mischsmp. mit Vergleichspräparat 120—122°; $[\alpha]_D^{16} = -18,2^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Methanol).



c) Dipeptid-Salz der 1-Nitronaphtalin-5-sulfonsäure: Die Mutterlauge B von der Isolierung des Tripeptids (vgl. dort) besteht aus 10 cm³ Wasser und 3,2 g Trockensubstanz; sie enthält schätzungsweise 2 g Dipeptid (Papierchromatogramm). Man verdünnt mit 7,4 cm³ 1-n. HCl, setzt 3,2 g 1-Nitronaphtalin-5-sulfonsäure, 2 H₂O¹⁾ zu, löst unter Röhren bei 90° und lässt langsam (1°/Min.) erkalten ohne den Rührer abzustellen. Bei 60—70° werden einige Impfkristalle zugesetzt. Nachdem man zum Schluss noch 1 Stunde bei 0—5° gerührt hat, werden die Kristalle abgesaugt, 2 mal mit wenig Eiswasser gedeckt und getrocknet: 2,82 g. Sie werden einmal aus der 10fachen Menge 0,5-n. HCl und einmal aus der 5fachen Menge Wasser umkristallisiert. Smp. 98—103°; Mischsmp. mit Vergleichspräparat 98—103°; $[\alpha]_D^{18} = +5,0^\circ \pm 0,6^\circ$ (c = 2 in Methylecellosolve).



d) Dipeptid: 200 mg des obigen Salzes werden in 10 cm³ H₂O gelöst, die Lösung langsam (1 cm³/Min.) durch eine Säule filtriert, die im oberen Teil aus 860 mg feuchtem Amberlite IR-4 B, HCl und im untern Teil aus 200 mg feuchtem Amberlite IR-4 B besteht. Das Eluat bleibt lackmusneutral und gibt nach Waschen der Säule mit 40 cm³ Wasser keine positive Ninhydrinprobe mehr. Das gesamte Eluat wird im Vakuum bei 40° zur Trockene verdampft; der Rückstand (95 mg, 95% der Theorie) wird durch Kristallisation aus verd. Äthanol gereinigt; Ausbeute 85 mg. Smp. 228—231°; Mischsmp. mit synthetischem Dipeptid 227—231°; $[\alpha]_D^{19} = +25,3^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in H₂O).



L-Methionin-tripeptid und Derivate.

a) Tripeptid: 4 g Methionin/Peptid-Gemisch werden fein verrieben, mit 40 cm³ abs. Äthanol versetzt, die Suspension zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Man lässt das Filtrat verschlossen erkalten, saugt nach 4 Std. von ausgeschiedenen Kristallen ab (470 mg) und verwendet die Mutterlauge zu nochmaligem Ausköchen des nicht in Lösung gegangenen Anteils. Man erhält so eine 2. Fraktion und durch weitere Wiederholung noch ein 3. und 4. Kristallisat. Die vereinigten Kristallitate wiegen ca. 1 g und bestehen hauptsächlich aus Methionin-dipeptid und -tripeptid: „Peptidfraktion“. Der in Alkohol unlösliche Rückstand enthält nur wenig Peptide; er lässt sich leicht auf L-Methionin verarbeiten.

4 g fein verriebene „Peptidfraktion“ werden mit 40 cm³ Wasser (20°) 15 Min. verrührt. Man saugt ab (Mutterlauge A), suspendiert den Rückstand (500 mg) ungewaschen in 10 cm³ Wasser und dialysiert die Suspension zur Abtrennung von Fermenteiweiß während 12 Std. bei 5° gegen 100 cm³ Wasser. Nach 6 maligem Erneuern des Wassers ist die Suspension peptidfrei (Papierchromatogramm). Die gesammelten Dialysate

1) W. H. Stein & S. Moore, loc. cit.

werden im Vakuum bei 40° fast zur Trockene eingeengt. Dabei bilden sich ca. 160 mg Kristalle, die laut Papierchromatogramm nur aus Tripeptid bestehen: Smp. 210–213°, teilweise Rekristallisation und erneutes Schmelzen bei 220°; $[\alpha]_D^{20} = -74^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,5 in Wasser). Nach Einengen von Mutterlauge A auf etwa 1/4 ihres Volumens und 24-stündigem Stehen bei 20° bilden sich Kristalle (300 mg), die abgesaugt (Mutterlauge B), durch 2maliges Umkristallisieren aus Wasser von wenig beigemengtem Dipeptid befreit werden (Papierchromatogramm) und nunmehr konstant bei 210–213° schmelzen, rekristallisieren und endgültig bei 219–220° schmelzen. Auch die Drehung: $[\alpha]_D^{16} = -70^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Wasser) ist konstant. Auf Grund des Papierchromatogramms und der Analysenresultate liegt reines Tripeptid vor.

| | | | |
|-------------------------|----------------|----------|------------|
| $C_{15}H_{29}O_4N_3S_3$ | Ber. C 43,77 | H 7,10 | N 10,22% |
| (411,6) | Gef. , , 44,13 | , , 7,12 | , , 10,06% |

b) Carboallyloxy-tripeptid-methylester: Man löst 100 mg Tripeptid bei 0° in 2,5 cm³ 0,1-n. NaOH, setzt 0,3 cm³ 1-n. NaOH und 0,032 cm³ Carboallyloxychlorid¹⁾ zu, röhrt 20 Min. bei 0°, wiederholt die Zugabe von Lauge und Carboallyloxychlorid, röhrt nochmals 20 Min. bei 0° und setzt 4 Tropfen Pyridin zu. Nach 5 Min. wird die Lösung mit Wasser aufs doppelte Volumen verdünnt, 2mal mit 6 cm³ Äther extrahiert, angesäuert (Kongo) und 3mal mit je 12 cm³ Essigester ausgeschüttelt. Der Essigesterauszug hinterlässt beim Eindampfen 110 mg (Ausbeute 90%) Säure. Da dieselbe nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, wurde sie mit Diazomethan in den Methylester übergeführt: mikrokristallines Pulver aus Essigester/Petroläther: Smp. 120–122°; Mischsmp. mit Vergleichspräp. 120–122°; $[\alpha]_D^{17} = -40,4^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

| | | | |
|-------------------------|----------------|----------|-----------|
| $C_{20}H_{35}O_6N_3S_3$ | Ber. C 47,15 | H 6,92 | N 8,25% |
| (509,7) | Gef. , , 47,23 | , , 6,78 | , , 8,45% |

c) Cbzo-tripeptid-methylester: Die Herstellung dieser Substanz erfolgte nach der beim Carboallyloxy-Derivat angegebenen Vorschrift. Die Ausbeute der Acylierung betrug hier jedoch nur 31%. Smp. 123–127°; Mischsmp. mit Vergleichspräp. 123–127°; $[\alpha]_D^{18} = -38,1^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

| | | | |
|-------------------------|----------------|----------|-----------|
| $C_{24}H_{37}O_6N_3S_3$ | Ber. C 50,59 | H 6,54 | N 7,38% |
| (569,7) | Gef. , , 50,67 | , , 6,60 | , , 7,26% |

II. Synthese der Vergleichspräparate.

L-Methionin-dipeptid und Derivate.

a) Azid-Verfahren.

Die Anwendung des Azid-Verfahrens zur Darstellung des L-Methionyl-L-methionins und die Herstellung der zugehörigen Zwischenprodukte ist, wie erwähnt, bercits von Dekker, Taylor & Fruton beschrieben worden²⁾. Wir können die Angaben dieser Autoren bestätigen und beschränken uns deshalb auf einige Ergänzungen.

D- und L-Methionin-methylester-hydrochlorid. Diese Hydrochloride werden nach unserer Erfahrung am einfachsten nach der Thionylchloridmethode³⁾ erhalten, indem das nach 2tägigem Stehen homogen gewordene Reaktionsgemisch mit einigen Impfkristallen versetzt wird. Man lässt 4 Std. stehen, setzt auf einen Teil Methionin 10 Vol.-Teile Äther zu, röhrt 1 Std. bei 0–5°, saugt die Kristalle ab und wäscht mit kaltem Äther gut nach. Ausbeute 82%. Zur völligen Reinigung wird aus Methanol/Essigester umkristallisiert.

¹⁾ C. M. Stevens & R. Watanabe, Am. Soc. **72**, 725 (1950).

²⁾ C. A. Dekker, S. P. Taylor & J. S. Fruton, loc. cit.; C. A. Dekker & J. S. Fruton, J. Biol. Chem. **173**, 471 (1948).

³⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, loc. cit.

D-Form: Smp. 140—142°; $[\alpha]_D^{21} = -26,3 \pm 0,8^\circ$ (c = 5 in Wasser)
 $(C_6H_{14}O_2NSCl \text{ (199,7): Ber. N } 7,01\% \text{ Gef. N } 6,74\%)$
 L-Form: Smp. 145—146°; $[\alpha]_D^{19} = +26,8^\circ \pm 0,8^\circ$ (c = 5 in Wasser)
 $(\text{Ber. C } 36,18 \text{ H } 7,03\% \text{ Gef. C } 36,43 \text{ H } 7,33\%)$

Cbzo-L-methionin¹⁾. Nach der üblichen Vorschrift²⁾ dargestellt und aus 4 Teilen Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert: Smp. 68—69°; $[\alpha]_D^{21} = -31,6^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

$C_{13}H_{17}O_4NS$ Ber. C 55,09 H 6,05 N 4,95%
 $(283,3)$ Gef. „ 54,91 „ 5,96 „ 5,12%

Cbzo-L-methionin-hydrazid¹⁾. 1,47 g (5 mMol) öliger Cbzo-L-methionin-methylester (aus Cbzo-L-methionin und Diazomethan, Smp. ca. 42°) werden mit 0,5 cm³ (10 mMol) Hydrazinhydrat und etwa 2 cm³ abs. Methanol versetzt, so dass eben eine homogene Mischung entsteht. Diese wird 24 Std. bei Zimmertemp. aufbewahrt. Man nimmt in 12 cm³ 1-n. HCl auf, extrahiert die Lösung mit wenig Chloroform und bringt sie hierauf unter Röhren durch Zusatz der berechneten Menge 2-n. $KHCO_3$ -Lösung auf pH 8. Man nimmt in Chloroform auf, wäscht einmal mit Wasser, trocknet und dampft ein. Zurück bleiben 1,4 g Hydrazid (Ausbeute 95%) vom Smp. 112—114°. Durch Umkristallisieren aus 4 Teilen Essigester steigt der Smp. und bleibt bei 121—122° konstant. $[\alpha]_D^{19} = -18,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 2 in Methanol).

$C_{13}H_{19}O_3N_3S$ Ber. C 52,49 H 6,44 N 14,14%
 $(297,4)$ Gef. „ 52,78 „ 6,50 „ 14,21%

Cbzo-L-methionyl-L-methionin-methylester. Es empfiehlt sich, die Azid-Kupplung folgendermassen durchzuführen: 2,4 g (12 mMol) L-Methionin-methylester-hydrochlorid werden in 10 cm³ abs. Methanol und 4,6 cm³ Chloroform gelöst, die auf 0° gekühlte Lösung wird mit der berechneten Menge Na-Methylat (ca. 0,5-n. in abs. Methanol) versetzt und auf —15° abgekühlt = „Esterlösung“.

3 g (10 mMol) Cbzo-L-methionin-hydrazid werden in einem Scheidetrichter, der in Eiswasser steht, durch Zusatz von 10 cm³ 1-n. HCl und etwas Eis gelöst. Man kippt nun durch einen weithalsigen Trichter eine eishaltige Nitritlösung (0,69 g $NaNO_2$ (10 mMol) in 50 cm³ H_2O) auf einmal zu, giesst sofort 50 cm³ eiskalten Essigester nach, schüttelt heftig durch, lässt die wässrige Phase in einen zweiten, mit 30 cm³ eiskaltem Essigester beschickten Scheidetrichter abfließen, schüttelt durch, trennt ab und verwirft die wässrige Phase. Die Essigesterlösung aus dem ersten Scheidetrichter wird sofort nach der Abtrennung der wässrigen Schicht ungewaschen und ungetrocknet durch Watte in die „Esterlösung“ filtriert. Der Essigester aus dem zweiten Scheidetrichter dient zum Waschen des ersten Scheidetrichters und wird hierauf ebenfalls in das Kupplungsgemisch filtriert, das nun in einem Bad von Eiswasser 3 Std. sich selbst überlassen bleibt. Zur Aufarbeitung wird im Vakuum bei 40° zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Lösung mit 2-n. HCl, 2-n. Soda und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft: Rohausbeute 3,85 g (90%). Die Hauptmenge wird vorteilhaft direkt weiter auf Cbzo-L-methionyl-L-methionin (siehe dort) verarbeitet. Eine durch Chromatographie (vgl. dazu die Angaben über die Isolierung von Cbzo-dipeptid-methylester aus dem enzymatisch gewonnenen Methionin/Peptid-Gemisch) und Kristallisation aus Aceton/Äther gereinigte Probe¹⁾ schmilzt bei 98—99°, rekristallisiert und schmilzt endgültig bei 104—105°. $[\alpha]_D^{19} = -28,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

$C_{19}H_{28}O_5N_2S_2$ Ber. C 53,25 H 6,59 N 6,54%
 $(428,6)$ Gef. „ 53,42 „ 6,69 „ 6,55%

Cbzo-L-methionyl-D-methionin-methylester. Die Darstellung erfolgt wie diejenige der diastereomeren L-L-Verbindung. Smp. 112—114°; $[\alpha]_D^{20} = +12,4^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol). Die Mischprobe mit der L-L-Verbindung schmilzt bei 90—94°.

Gef. C 52,98 H 6,55 N 6,26%

¹⁾ Mitbearbeitet von Herrn H. R. Rickenbacher.

²⁾ Organic Syntheses **23**, 13 (1943).

Cbzo-L-methionyl-L-methionin-isopropylester. Die Darstellung erfolgt unter Verwendung von L-Methionin-isopropylester-hydrochlorid¹⁾ wie diejenige des Methylesters. Smp. 91—92°; $[\alpha]_D^{20} = -29,5^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

| | | | |
|-------------------------|--------------|------------|-----------|
| $C_{21}H_{32}O_5N_2S_2$ | Ber. C 55,20 | H 7,01 | N 6,14% |
| (456,6) | Gef. , , | 55,46 6,91 | , , 6,25% |

Cbzo-L-methionyl-L-methionin. 3,5 g Cbzo-L-methionyl-L-methionin-methyl-ester (Rohprodukt) werden in 54 cm³ Methanol gelöst und nach Zugabe von 18 cm³ 1-n. KOH eine Std. bei 20° aufbewahrt. Die Lösung wird angesäuert (Kongo), fast zur Trockene eingeengt (40°, 15 mm Hg) und die dabei ausfallende Schmiere in Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung zuerst mit 2-n. HCl gewaschen und anschliessend abwechselnd mit 1-n. Soda und Wasser erschöpfend extrahiert. Die beim Ansäuern der wässerigen Auszüge ölig ausfallende Säure (3,3 g) wird in Essigester aufgenommen und durch Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther gereinigt. Man erhält 2,5 g Säure (60% bezogen auf eingesetztes Hydrazid) vom Smp. 118—120°. $[\alpha]_D^{20} = -18,4^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Methanol).

| | | | |
|-------------------------|--------------|------------|-----------|
| $C_{18}H_{26}O_5N_2S_2$ | Ber. C 52,25 | H 6,29 | N 6,50% |
| (414,5) | Gef. , , | 51,98 6,21 | , , 6,57% |

Aus der Mutterlauge lassen sich nochmals 600 mg reines Material gewinnen; obige Ausbeute vermehrt sich somit auf 75%. Der durch Veresterung der reinen Säure mit Diazomethan erhaltene Methylester besitzt dieselben Eigenschaften (Smp., Mischprobe, Drehung) wie obiger chromatographisch gereinigter Ester.

L-Methionyl-L-methionin. Zur Abspaltung der Cbzo-Gruppe muss hier Natrium in flüssigem Ammoniak verwendet werden, und es ist notwendig, die vom Methionin-schwefel teilweise abgespaltene Methylgruppe (Nitroprussidtest positiv) mit Hilfe von Methyljodid wieder einzuführen. Das von Ammoniak befreite, mit Wasser zersetzte Reaktionsgemisch enthält somit NaJ und Alkali. Vor allem die Gegenwart des letzteren bedeutet eine Erschwerung bei der Aufarbeitung. Durch die im folgenden beschriebene Verwendung von Amberlite IR-120²⁾ wird die Schwierigkeit weitgehend überwunden: die Ausbeute an reinem Dipeptid steigt von 39 auf 77%.

Man löst 1,92 g (4,64 mMol) Cbzo-L-methionyl-L-methionin in ca. 100 cm³ trockenem, flüssigem Ammoniak, röhrt heftig mit einem Vibromischer³⁾ und gibt ein Stück (320 mg, 13,9 mMol) blankgeschnittenes Natrium zu. Sobald die nach etwa 30 Sek. auftretende Blaufärbung der Lösung wieder verschwunden ist (ca. 3 Min.), werden 655 mg (4,64 mMol) Methyljodid in 6,5 cm³ abs. Toluol zugegeben. Man lässt den Ammoniak unter Feuchtigkeitsausschluss verdampfen, evakuiert das Reaktionsgefäß 3 mal, versetzt unter kräftigem Rühren mit 70 cm³ Wasser (20°) und destilliert zur Entfernung von Toluol und noch vorhandenem Ammoniak 5 Min. am Vakuum (Badtemp. 20°). Der Nitroprussidtest ist negativ. Unter Rühren werden nun 9,28 mVal Säure in Form von feuchtem Amberlite IR-120 (H-Form) zugesetzt: die Lösung ist nach 2 Min. laktusneutral, sie wird sofort vom Harz abdekantiert und letzteres mit Wasser gründlich gewaschen. Man vereinigt Dekantat und Waschwässer, verdampft am Vakuum zur Fast-Trockene und setzt 30 cm³ abs. Äthanol zu, worauf das Dipeptid auskristallisiert (1,1 g). Umkristallisieren durch Lösen in 14 cm³ heissem 60-proz. Äthanol und Zugabe von 28 cm³ heissem abs. Äthanol liefert 1 g (Ausbeute 77%) reines L-Methionyl-L-methionin: Smp. 229—231°; $[\alpha]_D^{24} = +27,0^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Wasser).

| | | | |
|-------------------------|--------------|------------|-----------|
| $C_{10}H_{20}O_3N_2S_2$ | Ber. C 42,80 | H 7,14 | N 10,00% |
| (280,4) | Gef. , , | 42,72 7,11 | , , 9,90% |

b) Diketopiperazin-Verfahren.

α) L-Methionin-diketopiperazin. α) 6,1 g L-Methionin-methylester (Sdp. 11 mm = 124—125°) werden während mehreren Monaten verschlossen bei Raumtemp. aufbewahrt.

¹⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, loc. cit.

²⁾ M. Brenner & C. H. Burckhardt, Helv. **34**, 1070 (1951).

³⁾ AG. für Chemie-Apparate Bau, Zürich.

Der zu einem festen Kristallkuchen erstarrte Kolbeninhalt wird im Mörser mehrmals mit Äther verrieben. Nach Absaugen bleiben 4,1 g (83%) Kristalle zurück, die durch Umkristallisieren aus 60-proz. Essigsäure leicht gereinigt werden können: 3,5 g; Smp. 232—233°; $[\alpha]_D^{23} = -42,7^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Eisessig).

| | | | |
|-------------------------|----------------|----------|------------|
| $C_{10}H_{18}O_2N_2S_2$ | Ber. C 45,80 | H 6,80 | N 10,68% |
| (262,4) | Gef. , , 45,89 | , , 6,82 | , , 10,53% |

DL-Methionin-methylester liefert bei analoger Behandlung ein Diketopiperazin vom Smp. 233—234°; Mischprobe mit dem optisch aktiven Produkt: 230—231°.

β)¹⁾ 14,6 g (75 mMol) **L**-Methionin-methylester-hydrochlorid werden in ca. 10 cm³ Wasser gelöst, mit 70 cm³ Äther überschichtet und alles auf 0° abgekühlt. Man setzt den Ester mit einer gesättigten, wässrigen Lösung von 21 g (150 mMol) K_2CO_3 frei und extrahiert die wässrige Phase noch 4 mal mit 30 cm³ Äther. Die Ätherlösungen werden mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei 40° eingedampft (Kolonne).

Der zurückbleibende ölige Ester (10,5 g; 88%) wird im Einschlussrohr unter Stickstoff 40 Std. auf 100° erwärmt. Die entstandene Kristallmasse wird wie unter α) beschrieben aufgearbeitet. Man erhält 5,4 g (65%) Diketopiperazin. Eine Probe wird umkristallisiert: Smp. 231—233°; $[\alpha]_D^{19} = -37,6^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Eisessig).

Dipeptid-Salz der 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure¹⁾. 5,25 g (20 mMol) nach β) erhaltenes rohes Diketopiperazin werden mit 10,5 cm³ konz. HCl (d = 1,19) übergossen und, sobald alles gelöst ist, in ein Ölbad von 140—150° getaucht. Vom Sieden an gerechnet wird die Lösung 90 Sek. unter Rückfluss gekocht, auf 20° abgeschreckt und mit 31,5 cm³ Wasser versetzt. Das unverseifte Diketopiperazin fällt fast quantitativ aus. Man saugt ab, deckt einmal mit Wasser und stellt das Filtrat zur späteren Verarbeitung auf die Seite. Das auf der Nutsche zurückgebliebene Diketopiperazin (2,4 g) wird mit Äthanol und Äther gewaschen und nochmals mit HCl gekocht usw. Nach der 4. Verseifung bleiben 330 mg (6%) unverseiftes Material zurück; $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ \pm 2^\circ$ (c = 2 in Eisessig). Die vereinigten 4 Filtrate werden mit 5,9 g 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure, 2 H₂O versetzt. Man erwärmt zur klaren Lösung (90°), impft möglichst heiß (70°) mit optisch reinem Dipeptid-Salz und lässt langsam auf 0° erkalten. Das auskristallisierende Salz (7,5 g; Ausbeute 68%) wird einmal aus 52,5 cm³ 0,5-n. HCl umkristallisiert (6,9 g; Smp. 98—100°) und ist nun genügend rein, um auf **L**-Methionyl-**L**-methionin verarbeitet zu werden (vgl. unten). Zur Herstellung eines Analysenpräparates wird eine Probe nochmals aus verd. HCl und ein weiteres Mal aus Wasser umkristallisiert: Smp. 98—103°; $[\alpha]_D^{21} = +5,1^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Methylcellosolve).

| | | | |
|---|----------------|----------|-----------|
| $C_{10}H_{20}O_3N_2S_2$, $C_{10}H_7O_5NS$, H ₂ O | Ber. C 43,56 | H 5,30 | N 7,62% |
| (55,6) | Gef. , , 43,32 | , , 5,51 | , , 7,33% |

L-Methionyl-**L**-methionin¹⁾. Die Zerlegung des obigen Salzes erfolgt nach den Angaben auf Seite 2090. Aus dem resultierenden Rohprodukt erhält man durch einmaliges Umkristallisieren (vgl. Seite 2093) 3,18 g reines Dipeptid (Ausbeute 57% bezogen auf Diketopiperazin); Smp. 228—231°; $[\alpha]_D^{20} = +26,4^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Wasser).

L-Methionyl-**L**-methionin-äthylester, Salz mit 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure. 320 mg (1,22 mMol) **L**-Methionin-diketopiperazin ($[\alpha]_D^{23} = -42,7^\circ$) werden in 16 cm³ abs. Äthanol suspendiert und letzterer bei 0° mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Die Lösung wird 10 Min. unter Rückfluss gekocht (Bad 130°), im Vakuum bei 40° zur Trockene verdampft und der Rückstand in 10 cm³ Wasser aufgenommen. Man filtriert von etwas ungelöstem Diketopiperazin ab (25 mg; Smp. 234—236°; $[\alpha]_D^{22} = -42,0^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Eisessig)), setzt zum Filtrat 300 mg 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure, 2 H₂O zu, erwärmt und lässt das Salz durch langsames Erkalten auskristallisieren: 550 mg (82%); Smp. 201—202°; $[\alpha]_D^{23} = +19,4^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Pyridin).

| | | | |
|--|----------------|----------|-----------|
| $C_{12}H_{24}O_3N_2S_2$, $C_{10}H_7O_5NS$ | Ber. C 47,04 | H 5,56 | N 7,48% |
| (561,6) | Gef. , , 46,86 | , , 5,45 | , , 7,20% |

¹⁾ Mitbearbeitet von Herrn *A. Vetterli*.

a) Feine Hohlräume in der Diphenylschmelze können nicht mit Sicherheit vermieden werden, was auch aus dem relativ niedrigen spez. Gewicht der Schmelze (vgl. S. 2093) hervorgeht. Das kurze Evakuieren bei -80° dürfte keine merklichen Diphenylverluste verursachen.

b) Der Schwärzungsvergleich entfernter Stellen einer photographischen Platte erlaubt keine sehr genaue Spektrophotometrie, da die Empfindlichkeit und Gradation der Platte, die Wellenlängenabhängigkeit dieser Größen und schliesslich auch die schwache Schwärzung des unbelichteten Plattenuntergrundes örtlichen Schwankungen unterliegen. Bei spektrophotometrischen Methoden, die auf dem Schwärzungsvergleich benachbarter Plattenstellen beruhen, machen sich diese Fehlerquellen weniger bemerkbar; die Extinktionsmessung mittels dieser Verfahren erreicht eine Genauigkeit von $\pm 2\%$. In Hinblick auf die beabsichtigte Aufnahme der Extinktionskurve des fein strukturierten Benzoldampfspektrums nahmen wir die geringere Genauigkeit der vorstehend beschriebenen Methode in Kauf, da diese die Erfassung feiner spektraler Strukturen gewährleistet.

Anschliessend an die Prüfung der Fehlerquellen untersuchten wir in orientierender Art die Gültigkeit des *Lambert-Beer*'schen Gesetzes und fanden es bei ca. 100fach variierter Konzentration des Diphenyldampfes innerhalb etwa $\pm 10\%$ erfüllt.

Ergebnisse.

Die Extinktionskurve des Diphenyldampfes wurde mittels der dargelegten Versuchstechnik im Spektralbereich von 31000 bis 46000 cm^{-1} bei den Temperaturen 170, 260, 360 und 520°C aufgenommen. Bei denselben Temperaturen haben wir den Einfluss der Fremdgase Helium, Wasserstoff, Kohlendioxyd, Wasserdampf und Äthylen auf die Extinktionskurve geprüft. Die Diphenyldampfkonzentration betrug bei beiden Arten von Aufnahmen $1,32 \cdot 10^{-5}$ — $1,45 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Schliesslich nahmen wir zum Vergleich $1,03 \cdot 10^{-3}$ und $5,15 \cdot 10^{-5}$ molare Lösungen von Diphenyl in optisch reinem Hexan bei 20° mit einem *Beckman-Spektrophotometer* auf¹⁾.

Figur 1a zeigt die mit reinem Diphenyldampf erhaltenen Extinktionskurven; die Kurve von Diphenyl in Hexan ist mit eingetragen. Figur 1b—f zeigt die unter Fremdgaszusatz erhaltenen Extinktionskurven des Diphenyldampfes. Die den Kurven der Figur 1a zugrunde gelegten Extinktionsdaten wurden durch Mittelung innerhalb 500 cm^{-1} (30—50 Å) breiter Frequenzintervalle erhalten. Die Mittelwerte (aus 5—10 Einzelmessungen) sind mit einem durchschnittlichen Fehler von 6% behaftet. Die Daten betreffend Fremdgaszusatz beruhen jeweils auf einer Aufnahmeserie und weisen daher eine geringere Genauigkeit auf. Eine tabellarische Zusammenfassung der Messergebnisse findet sich in der Dissertation *H. Laemmeli*²⁾.

Wie die Figur 1a zeigt, erfährt das Intensitätsmaximum des Diphenyldampfspektrums bei Erhöhung der Temperatur von 170 auf 520° eine beträchtliche Abnahme. ε_{max} beträgt bei 170, 260, 360

¹⁾ Wir verdanken Herrn Prof. Dr. *F. Leuthardt* die Erlaubnis zur Benützung dieses Apparates.

²⁾ *H. Laemmeli*, Dissertation an der Universität Zürich, 1950.

Zusammenfassung

Aus dem Reaktionsgemisch von DL-Methionin-isopropylester und einem Chymotrypsin-haltigen Enzympräparat sind zwei Peptide isoliert und als L-Methionyl-L-methionin bzw. L-Methionyl-L-methionyl-L-methionin identifiziert worden. Damit ist der frühere papierchromatographische Befund bestätigt und das Vorliegen einer enzymatischen Peptidsynthese aus Aminosäureestern endgültig bewiesen.

Im Zusammenhang mit der Beschaffung der synthetischen Vergleichssubstanzen ist die Bereitung und Aufspaltung des L-Methionindiketopiperazins zu einer bequemen Darstellungsmethode für das optisch aktive Dipeptid ausgearbeitet worden. Andrerseits konnten die Literaturangaben über die Darstellung dieses Dipeptids nach dem Azid-Verfahren in einigen Punkten ergänzt werden.

Die Synthese des freien L-Methionyl-L-methionyl-L-methionins stiess auf unerwartete Schwierigkeiten, indem es sich zeigte, dass die reduktive Abspaltung (Natrium/flüssiger Ammoniak) der Cbz-Gruppe mit einem vorläufig nicht abgeklärten Verlust der optischen Drehung verbunden ist.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

254. Enzymatische Peptidsynthese.

3. Mitteilung¹⁾.

Peptidbildung aus DL-Threonin-isopropylester

von M. Brenner, E. Sailer und K. Rüfenacht.

(15. VIII. 51.)

Wie wir bereits kurz mitgeteilt haben, bildet sich bei der Einwirkung von Chymotrypsin, bzw. Chymotrypsinkonzentraten auf den Isopropylester des DL-Threonins in optisch asymmetrischer Reaktion ein Gemisch von unverändertem Threonin-isopropylester, freiem Threonin und Threoninpeptiden²⁾.

Der Anteil an Peptiden ist hier grösser als im Falle der analogen Reaktion von Methionin-estern. Es war zum Beispiel nicht möglich, aus dem Reaktionsgemisch reines, optisch aktives Threonin zu isolieren. Auch Threonin-dipeptid und andere niedermolekulare, dialysierbare Threoninpeptide sind in so geringer Menge vorhanden, dass sie vorläufig nur papierchromatographisch nachgewiesen werden konnten.

¹⁾ 2. Mitteilung M. Brenner & R. W. Pfister, *Helv.* **34**, 2085 (1951).

²⁾ M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, *Helv.* **33**, 568 (1950).