

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. Andererseits 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).

Dieser Nachweis beruht teils auf direktem Vergleich in Parallelchromatogrammen (Threonin, Threonindipeptid) und teils auf der bekannten Perjodsäurereaktion (Bildung von Acetaldehyd aus Substanzen mit der Gruppe $\text{CH}_3\text{--CH(OH)--CH(NH}_2\text{)--CO--}$)¹). Letztere lässt sich, wie wir im experimentellen Teil beschreiben, leicht auf Papierchromatogramme übertragen. 25 γ Threonin sind dabei noch sehr gut zu erkennen.

Andrerseits ist die Ausbeute an Produkten, die nicht dialysieren, sich nicht an Amberlite IR-100 adsorbieren lassen und zum Teil schwerlöslich sind, beträchtlich. Diese Substanzen bilden vor allem beim Abkühlen stark viskose Lösungen und bestehen, wie Threonin-Bestimmungen vor und nach Hydrolyse mit HCl ergaben, offenbar aus höheren Threonin-oligopeptiden: vor der Hydrolyse war mittels der Perjodsäurereaktion nur etwa ein Zehntel des total vorhandenen Threonins nachweisbar.

Die Reaktionsprodukte sind je nach der Qualität der verwendeten Fermentpräparate mehr oder weniger stark durch Beimengungen aus diesen Präparaten verunreinigt. So beträgt der Gehalt an Totalthreonin im Mittel nur 60–80 % vom Gesamtgewicht der schwerlöslichen Peptidfraktion. Die Trennung und Isolierung threoninhaltiger Substanzen wird dadurch, namentlich bei Verwendung von Chymotrypsinkonzentraten, erschwert.

Wir entschlossen uns deshalb zu einem partiellen Abbau des in Wasser schwerlöslichen, weiter aber nicht gereinigten Reaktionsproduktes, um wenigstens seine Peptidnatur durch Isolierung eines peptidartigen Abbauproduktes sicherzustellen. Zu diesem Zweck wurde das schwerlösliche Material partiell verseift. Nach Veresterung und Tosylierung liess sich dann durch Chromatographie an Aluminiumoxyd N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester isolieren. Dieser Körper war nach Schmelzpunkt, Mischprobe und Drehung mit dem entsprechenden synthetischen Produkt identisch. Damit ist die enzymatische Bildung von Threoninpeptiden nicht nur papierchromatographisch, sondern auch präparativ bewiesen.

Das zum Vergleich benötigte Dipeptidderivat wurde aus N-Tosyl-L-threonin, bzw. L-Threonin²) in üblicher Weise durch Kupplung des N-Tosyl-L-threonin-azides mit L-Threonin-methylester dargestellt. Das für den papierchromatographischen Vergleich benötigte Threonindipeptid ist durch Hydrolyse von Threonin-diketopiperazin bereitet und ohne Abtrennung des ebenfalls entstandenen Threonins direkt verwendet worden.

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

Experimenteller Teil.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler-Block* bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

¹) R. J. Block & D. Bolling, *Determination of Amino Acids*, Minneapolis 1945, S. 31.

²) Die Darstellung dieser Ausgangsmaterialien wird in einer separaten Arbeit beschrieben.

A: Fermentansätze; Isolierung von N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester.

1. Analytische Methoden. a) *Papierchromatogramme*: Alle Chromatogramme wurden nach der schon früher¹⁾ verwendeten Technik ausgeführt. R_F -Werte: Threonin 0,18; Threonindipeptid 0,36.

b) *Threoninanalysen*: Die quantitativen Threonin- und Threonin-Endgruppenbestimmungen wurden nach dem Verfahren von *T. Winnik*²⁾ in etwas abgeänderter Weise mit Hilfe der Mikrodiffusionstechnik von *E. Conway*³⁾ ausgeführt. An Stelle der freien Perjodsäure verwendeten wir jeweils 1 ml einer Lösung des Na-Salzes in Salpetersäure (46,2 g NaJO_4 in 1000 ml 2-n. HNO_3) und brachten das Oxydationsgemisch mit Phosphatpuffer auf pH 7.

Zum qualitativen Threoninnachweis wird die zu untersuchende Substanz in zwei Proben nebeneinander papierchromatographiert. Man schneidet das Papier in zwei Streifen, entwickelt den einen mit Ninhydrin und kann dann auf dem andern die den gebildeten Flecken entsprechenden Stellen ausschneiden. Die herausgeschnittenen Papierstücke werden zerkleinert, in den äusseren Teil von *Conway*-Schalen gelegt und mit wenig Wasser befeuchtet. Mit der oben beschriebenen Perjodsäurelösung werden die auf dem Papier befindlichen threoninhaltigen Produkte bei pH 7 oxydiert, während der innere Teil der Schalen eine jeweils frisch bei Zimmertemperatur bereitete, gesättigte Lösung von p-Oxydiphenyl in konzentrierter Schwefelsäure enthält. Der bei Anwesenheit von Threonin abgespaltene Acetaldehyd diffundiert in den inneren Teil der Schalen und bewirkt allmählich eine intensiv blaurote Färbung der Schwefelsäurelösung, die sich nach einer Stunde nicht mehr verändert. Kontrollversuche mit *Whatman*-Papier reagieren erst nach mehreren Stunden schwach.

2. Qualitatives Verhalten von DL-Threonin-isopropylester gegen verschiedene Fermentpräparate. Für alle Ansätze wurde stets frisch bereiteter Ester verwendet⁴⁾.

a) Kristallisiertes Chymotrypsin (*Armour*)⁵⁾: Chymotrypsin (25 mg) (50% Ammoniumsulfat enthaltend), bei 0° in 0,25 ml Wasser gelöst, wurde zu 250 mg DL-Threonin-isopropylester gegeben und die Mischung bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Sie trübte sich nach wenigen Minuten und war nach 20 Stunden vollständig erstarrt. Nach 48 Stunden wurde mit 10 ml Äther versetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Ausbeute 100 mg. Das Papierchromatogramm dieses Rohprodukts zeigte unter anderem neben Threonin einen deutlichen Dipeptidfleck.

b) Kristallisiertes Trypsin (*Armour*)⁵⁾: Ansatz wie bei Chymotrypsin. Die nach Zugabe des Fermentes zuerst schwach trübe, nach wenigen Minuten aber klare Lösung veränderte sich beim Stehen nicht. Wie auch das Papierchromatogramm zeigte, war praktisch keine Reaktion eingetreten.

c) Dänisches NOVO-Ferment⁵⁾: 500 mg Rohferment wurden bei 0° in 5 ml Wasser aufgeschlämmt. 0,5 ml der abfiltrierten Lösung vermischte man mit 500 mg Threoninester. Das bei Raumtemperatur aufbewahrte Gemisch erstarrte nach kurzer Zeit. Ausbeute 125 mg. Papierchromatographisch war eine deutliche Peptidbildung zu erkennen. Ein gleicher Ansatz bei 38° gab keine Reaktion.

d) Kontrollansatz mit Wasser, ohne Ferment: Gleiche Bedingungen wie bei den obigen Ansätzen. Nach dreitägigem Stehen war auf dem Papierchromatogramm neben dem sehr starken Fleck von unverändertem Threoninester nur ganz wenig Threonin zu erkennen.

¹⁾ *M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister*, loc. cit. p. 582.

²⁾ *T. Winnik*, *J. Biol. Chem.* **142**, 461 (1942).

³⁾ *E. Conway*, *Microdiffusion Analysis*, 2. Aufl., London 1947, S. 224.

⁴⁾ Darstellung siehe weiter unten.

⁵⁾ Herkunft, bzw. Bereitung der Fermente siehe *M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister*, loc. cit. p. 571/572.

Obwohl die Ausbeute mit kristallisiertem Chymotrypsin besser ist als mit dem NOVO-Ferment, wurde für die präparativen Ansätze das letztere verwendet, da uns Chymotrypsin nicht in genügender Menge zur Verfügung stand. Merkwürdigerweise reagiert dialysiertes und lyophilisiertes NOVO-Ferment („dänisches Ferment“¹⁾) schlechter als das rohe Ferment.

3. Präparativer Ferment-Ansatz. 4 g rohes NOVO-Ferment wurden in 20 ml Wasser aufgeschlämmt und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen, die Suspension filtriert und 18,5 ml des Filtrates bei 20° mit 18,5 g DL-Threonin-isopropylester vermischt. Die zuerst klare Lösung erstarrte schon nach einer Stunde. Nach drei Tagen rührte man mit 100 ml Äther an und extrahierte das ausgefallene Produkt 24 Stunden im Soxhlet-Apparat mit Äther. Ausbeute an ätherunlöslichem, weissem, flockigem Reaktionsprodukt: 9,8 g. Davon entfielen höchstens 3 g auf Fermentsubstanz, da bei der Bereitung der Fermentlösung ungefähr ein Viertel ungelöst blieb.

Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen, getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Hochvakuum bei 80° und 0,03 mm Hg destilliert. 7,0 g des so zurückgewonnenen Threonin-isopropylesters (hauptsächlich D-Form) versetzte man nochmals mit 7,0 ml Fermentlösung. Es trat jedoch nur noch eine schwache Reaktion ein. Nach gleicher Aufarbeitung wie oben konnte noch 1 g Reaktionsprodukt isoliert werden.

4. Partielle Hydrolyse des in Wasser schwerlöslichen Fermentreaktionsproduktes und Isolierung von Threonindipeptid als N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester. 16,5 g rohes Fermentreaktionsprodukt wurden mit 500 ml einer 1-proz. wässrigen Phenollösung²⁾ bei Zimmertemperatur angerührt, die Suspension dann auf dem Wasserbad auf 90° erwärmt, nach dem Abkühlen zentrifugiert, der Niederschlag gewaschen und getrocknet. Das so gewonnene schwerlösliche Produkt wog 6,41 g.

3,0 g dieses Materials übergoss man mit 60 ml konzentrierter Salzsäure ($d = 1,19$), schüttelte gut durch, wobei der grösste Teil in Lösung ging, und liess acht Tage bei Zimmertemperatur stehen. (Bei einem papierchromatographisch verfolgten Vorversuch war bis zum achten Tag eine stetige Zunahme, nach dem zehnten Tag wieder eine Abnahme der Dipeptidmenge zu beobachten.) Dann wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft (Badtemperatur unter 40°) und durch wiederholtes Eindampfen mit Methanol alle wässrige Salzsäure entfernt. Durch Verestern mit methanolischer Salzsäure und anschließende Tosylierung entstanden 1,7 g öliges, in Essigester lösliches Produkt. Dieses unterwarf man, in 25 ml Benzol gelöst, der Chromatographie an 45 g Aluminiumoxyd.

500 mg Öl, die durch 300 ml Chloroform/1% Methanol eluiert wurden, kristallisierten, in Chloroform aufgenommen, bei Zusatz von Petroläther. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Chloroform blieben 120 mg konstant bei 181—182° schmelzendes Produkt. $[\alpha]_D^{18} = -16,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol). Der Mischschmelzpunkt mit synthetischem Material (Smp. 182—183°; $[\alpha]_D^{17} = -15,9^\circ$) lag bei 181—183°. Ein Analysenpräparat wurde drei Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{16}H_{24}O_7N_2S$	Ber.	C 49,47	H 6,23	N 7,21	OCH ₃ 7,99%
(388,43)	Gef.	„ 49,51	„ 6,08	„ 7,23	„ 7,86%

Aus der Benzol/Äther 1:1-Fraktion des Chromatogramms konnte in geringer Menge ein kristallisierter Körper mit Smp. 99—100° gewonnen werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um N-Tosyl-L-threonin-methylester.

¹⁾ Herkunft bzw. Bereitung der Fermente siehe M. Brenner, H. R. Müller & R. W. Pfister, loc. cit. p. 571/572.

²⁾ Da der wässrige Auszug noch andern Versuchen diente, erfolgte zum Zweck der Konservierung ein Phenolzusatz.

B: Synthesen von Ausgangsmaterial und Vergleichssubstanzen.

1. DL-Threonin-isopropylester. 12 g DL-Threonin wurden in 150 ml abs. Isopropylalkohol suspendiert. Beim Einleiten von trockenem HCl-Gas in raschem Strom erwärmte sich das Gemisch unter Auflösung des Threonins auf etwa 70°. Man kochte hierauf eine halbe Stunde unter Rückfluss und destillierte dann den überschüssigen Isopropylalkohol im Vakuum ab (Badtemperatur unter 40°). Das zurückbleibende, zähflüssige Öl wurde nochmals in 100 ml abs. Isopropylalkohol aufgenommen, die Lösung mit HCl gesättigt und einige Minuten am Rückfluss gekocht. Durch wiederholtes Eindampfen mit Isopropanol im Vakuum liess sich überschüssige Salzsäure entfernen. Das erhaltene Esterhydrochlorid konnte nicht kristallisiert werden.

Die Freisetzung des Esters erfolgte nach *Hillmann*¹⁾ durch Suspension des Hydrochlorids in 150 ml Chloroform und Versetzen mit einer 2-proz. ammoniakalischen Chloroformlösung unter Eiskühlung, bis die Lösung deutlich phenolphthaleinalkalisches war. Das ausgefallene Ammoniumchlorid konnte gut abfiltriert werden. Nach dem Abdampfen des Chloroforms im Vakuum wurde der Ester im Hochvakuum destilliert. Sdp. 80–82°/0,03 mm, Badtemp. 90–100°. Ausbeute 8,0 g (52% der Theorie).

2. DL-Threonin-diketopiperazin. 10,0 g roher DL-Threonin-methylester, frisch dargestellt durch Veresterung von DL-Threonin mit methanolischer Salzsäure und durch Freisetzung nach *Hillmann*¹⁾, wurden 4 Tage bei 50° stehengelassen. Die erstarrte Masse rührte man mit 80 ml Äther an und filtrierte ab. Ausbeute 4,7 g (62% d. Th.) schwach gelbliches Produkt, welches mit Ninhydrin und bei der Perjodsäureprobe²⁾ keine Reaktion gab. Man kristallisierte um, indem man in möglichst wenig Wasser löste, das gleiche Volumen Alkohol und das gleiche Volumen Äther zugab. Bei langsamem Erhitzen sublimierte die Substanz allmählich ab 190° in Kristallen und verflüchtigte sich gegen 260° vollständig; bei raschem Erhitzen erfolgte bei 240° eine spontane Sublimation in Tröpfchen. Zur Analyse wurde 3 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_8H_{14}O_4N_2$	Ber.	C 47,51	H 6,98	N 13,86%
(202,21)	Gef.	„ 47,66	„ 6,91	„ 13,58%

3. DL-Threonin-dipeptid aus Diketopiperazin. Man löste 2,0 g DL-Threonin-diketopiperazin in 20 ml 20-proz. Bromwasserstoffsäure und erwärmte 30 Minuten auf 100°. Dann wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und durch mehrmaliges Eindampfen mit Wasser überschüssiges HBr entfernt. Wie durch ein Papierchromatogramm festgestellt werden konnte, waren etwa zwei Drittel der Substanz zu Dipeptid verseift worden.

4. N-Tosyl-threonin-methylester. L-Form: 1,4 g N-Tosyl-L-threonin³⁾ wurden in 50 ml abs. Methanol, welches bei 0° mit trockenem HCl-Gas gesättigt worden war, gelöst. Man liess über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, dampfte bei einer Badtemperatur von 35° das Methanol ab und nahm den kristallinen Rückstand in 25 ml Chloroform auf. Diese Lösung wurde mit 4 ml 10-proz. $KHCO_3$ -Lsg. und mit 4 ml Wasser gewaschen, Hydrogencarbonat- und Wasserauszug zweimal mit je 5 ml Chloroform geschüttelt, die vereinigten Chloroformauszüge mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne verdampft. Rückstand 1,43 g (97% d. Th.); Smp. 99–100°.

120 mg des Rohprodukts wurden durch zweimaliges Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther zu Analyse und Drehung gereinigt. Die feinen Nadelchen schmolzen bei 100–101°. $[\alpha]_D^{16} = -8,0 \pm 0,6$ (c = 2 in Methanol). Das Trocknen erfolgte im Hochvakuum 6 Stunden bei 60°.

$C_{12}H_{17}O_5NS$	Ber.	C 50,16	H 5,96	N 4,88%
(287,33)	Gef.	„ 50,23	„ 5,89	„ 5,03%

D-Form: Analog dargestellt, besass sie den gleichen Schmelzpunkt und eine gleich-grosse, entgegengesetzte Drehung.

Gef.	C 50,07	H 5,98%
------	---------	---------

¹⁾ G. Hillmann, Z. f. Naturforschg. 1, 682 (1946).

²⁾ Vgl. Seite 2098.

³⁾ Darstellung dieses Körpers wird in einer separaten Arbeit beschrieben.

DL-Form: Die ebenfalls analog aus N-Tosyl-DL-threonin¹⁾ dargestellte racemische Form schmolz bei 88–89°.

Gef. C 50,14 H 5,82%

5. N-Tosyl-threonin-hydrazid. **L-Form:** 1,27 g roher N-Tosyl-L-threonin-methylester wurden in 1,3 ml Methanol gelöst und mit 0,9 g Hydrazinhydrat versetzt. Beim Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur erstarrte das Gemisch, wurde dann mit 10 ml Wasser verrührt, mit Eisessig tropfenweise versetzt, bis Brilliantpapier²⁾ nicht mehr gerötet wurde, filtriert und der Rückstand mit 2 ml Eiswasser gewaschen. Ausbeute 1,15 g (90% d. Th.) mit Smp. 194–196°.

100 mg des Rohproduktes wurden zu Analyse und Drehung zweimal aus 2,5 bzw. 2,0 ml Methanol umkristallisiert und 6 Stunden bei 90° im Hochvakuum getrocknet. Der Smp. schwankte je nach Aufheizgeschwindigkeit zwischen 195 und 197°. $[\alpha]_D^{16} = -19,8^\circ \pm 1,7^\circ$ (c = 1 in Methanol).

$C_{11}H_{17}O_4N_3S$	Ber.	C 45,97	H 5,96	N 14,62%
(287,34)	Gef.	„ 46,16	„ 5,74	„ 14,52%

D-Form: Die Darstellung erfolgte analog. Der Schmelzpunkt war wie derjenige der L-Form. $[\alpha]_D^{16} = +19,4^\circ \pm 2,0^\circ$ (c = 0,7 in Methanol).

6. N-Tosyl-threonyl-threonin-methylester. **L, L-Form:** 1,5 g L-Threonin¹⁾ wurden in 50 ml abs. Methanol suspendiert. Durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas entstand innert 20 Min. eine homogene, heisse Lösung. Man kühlte auf 0°, sättigte mit HCl-Gas und liess vier Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Eindampfen im Vakuum bei einer Badtemperatur von 40° blieb ein zähflüssiges Öl zurück. Durch zweimaliges Eindampfen mit je 30 ml Methanol wurde überschüssige Salzsäure entfernt.

Zur Freisetzung des Esters aus dem Hydrochlorid wurde in 15 ml Methanol gelöst und bei 0° zunächst mit der auf das eingesetzte L-Threonin berechneten Menge methanolischer, ungefähr 1-n. Natriummethylatlösung (10 ml) versetzt. Durch Zugabe von weiteren 2 ml Natriummethylatlösung wurde die Lösung schwach phenolphthaleinalkalisches gemacht. Sie musste nun sofort für die Kupplung mit dem im folgenden beschriebenen Azid verwendet werden. Das ausfallende Kochsalz stört nicht.

1,07 g N-Tosyl-L-threonin-hydrazid wurden in 13 ml Wasser durch Zugabe der berechneten Menge n. Salzsäure (3,73 ml) gelöst und rasch mit 270 mg Natriumnitrit, gelöst in 2,5 ml Wasser, versetzt. Das sofort ausfallende Azid nahm man in 30 ml eiskaltem Essigester auf und schüttelte die wässrige Lösung nochmals mit 20 ml Essigester aus.

Die vereinigten, in der Kälte über Na_2SO_4 getrockneten Essigesterauszüge wurden in die oben beschriebene, eiskalte Lösung des L-Threoninesters gegossen, das Gemisch mit 1 ml der erwähnten Natriummethylatlösung schwach phenolphthaleinalkalisches gemacht und 2 Stunden im Eis stehengelassen.

Der nach dem Abdampfen der Lösungsmittel (im Vakuum, Badtemperatur 40°) verbleibende Rückstand wurde in 40 ml Essigester aufgenommen und je zweimal mit je 5 ml 10-proz. $KHCO_3$ -Lsg., 2-n. HCl und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Essigesters blieben 1,18 g (80% d. Th.) kristallisiertes, rohes Kupplungsprodukt zurück.

Durch Umkristallisieren aus Chloroform (100fache Menge), wobei restloses Auflösen halbstündiges Kochen am Rückfluss erforderte, konnten insgesamt 655 mg Substanz mit einem Schmelzpunkt von 178–183° gewonnen werden. Nochmaliges Umkristallisieren aus Chloroform und aus Wasser lieferte 500 mg reinen N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester mit Smp. 182–183°. Zu Analyse und Drehung wurde 6 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet. $[\alpha]_D^{17} = -15,9 \pm 0,6^\circ$ (c = 2 in Methanol).

$C_{16}H_{24}O_7N_2S$	Ber.	C 49,47	H 6,23	N 7,21%
(388,43)	Gef.	„ 49,37	„ 6,19	„ 7,29%

¹⁾ Darstellung dieses Körpers wird in einer separaten Arbeit beschrieben.

²⁾ Brilliant-Gelb („Geigy“), Kupplungsprodukt von tetrazotierter 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfosäure mit Phenol; Umschlag pH 7,4–8,6.

Durch Chromatographie der eingeeigneten Chloroformmutterlaugen an Aluminiumoxyd konnten 300 mg einer Substanz gewonnen werden, die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther bei 99–100° schmolz und durch Mischschmelzpunkt, Drehung und Analyse eindeutig als N-Tosyl-L-threonin-methylester identifiziert werden konnten. Dieser Körper scheint durch Umsetzung des Azides mit dem als Lösungsmittel verwendeten Methanol entstanden zu sein. Fast 30% des eingesetzten Hydrazids sind darin enthalten.

D,D-Form: Die Darstellung erfolgte analog. Smp. 182–184°, $[\alpha]_D^{20} = +16,0^\circ \pm 1^\circ$ (c = 2 in Methanol.)

Gef. C 49,70 H 6,42 N 7,46%.

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolabor der Organ.-chem. Anstalt, Basel (Leitung E. Thommen), ausgeführt.

Zusammenfassung.

Der Isopropylester des Threonins reagiert mit Chymotrypsinpräparaten unter Bildung von Peptiden.

Nach partieller Hydrolyse des in Wasser schwerlöslichen Anteils der Fermentreaktionsprodukte wird L,L-Threonin-dipeptid in Form von N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester isoliert.

Als Vergleichsmaterial zur Sicherstellung der Konstitution dieses Abbauproduktes werden N-Tosyl-L-threonyl-L-threonin-methylester und dessen optischer Antipode synthetisch aufgebaut.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

255. Darstellung von L- und D-Threonin durch Racematspaltung von N-Tosyl-DL-Threonin

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

(15. VIII. 51.)

DL-Threonin ist durch neuere Synthesen gut zugänglich geworden¹⁾. Elliott konnte eine optische Spaltung direkt in eine solche Synthese einbauen²⁾. Die von DL-Threonin selbst ausgehende Aufspaltung über die Brucinsalze des N-p-Nitrobenzoylderivates³⁾ scheint gelegentlich mit gewissen Schwierigkeiten verbunden zu sein; auch ist die Isolierung der als Zwischenprodukte auftretenden N-Acylderivate der optisch aktiven Formen nicht beschrieben.

Da wir im Laufe unserer Untersuchungen N-Tosyl-L-threonin benötigten⁴⁾, entwickelten wir eine Methode, die über die Tosylderivate verläuft und überall mit einem Minimum an Kristallisationsprozessen

¹⁾ K. Pfister, C. A. Robinson, A. C. Shabica & M. Tishler, Am. Soc. **71**, 1101 (1949); J. Attenburrow, D. F. Elliott & G. F. Penny, Soc. **1948**, 310.

²⁾ D. F. Elliott, Soc. **1950**, 62.

³⁾ A. J. Zambito, W. L. Peretz & E. E. Howe, Am. Soc. **71**, 2541 (1949).

⁴⁾ M. Brenner, E. Sailer & K. Rüfenacht, Helv. **34**, 2096 (1951).