

335. Max Bergmann, Leonidas Zervas und Jesse P. Greenstein¹⁾: Synthese von Peptiden des *d*-Lysins: *d*-Lysyl-*d*-glutaminsäure und *d*-Lysyl-*l*-histidin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung, Dresden.]

(Eingegangen am 14. Oktober 1932.)

Für die Erschließung der natürlichen Eiweißstoffe genügt es nicht festzustellen, welche Amino-säuren am Aufbau des einzelnen Proteins beteiligt sind; man will auch wissen, welche Amino-säuren in direkter Peptid-Bindung miteinander stehen und in welcher Reihenfolge sie verbunden sind. Wir erwarteten, nach dieser Richtung Aufschlüsse zu erhalten durch die Synthese bisher unbekannter Peptide, die Prüfung ihres Verhaltens gegen Fermente und den Vergleich des Ergebnisses mit dem ferment-chemischen Verhalten der natürlichen Proteine.

Die Durchprüfung derartiger systematischer Versuche hat allerdings ein leistungsfähiges Verfahren der Peptid-Synthese zur Voraussetzung. Wir haben unser kürzlich beschriebenes Carbobenzoxy-Verfahren²⁾ schon mehrfach nach dieser Richtung ausgewertet. Wie schildern im folgenden seine Verwendung, um Diamino-säuren mit ihrem Carboxyl in Peptid-Bindung überzuführen, und beschreiben im besonderen die Gewinnung von *d*-Lysyl-*d*-glutaminsäure und *d*-Lysyl-*l*-histidin. Dipeptide vom Typus der Lysyl-glutaminsäure, d. h. aus einer Diamino-säure und einer Amino-dicarbonsäure, waren der Synthese bisher unzugänglich. Von Dipeptiden aus zwei Diamino-säuren waren nur vereinzelte bekannt, und zwar nur solche, die aus zwei gleichartigen Komponenten aufgebaut waren. Die Kenntnis der beiden neuen Peptid-Typen ist auch für physiko-chemische Untersuchungen sehr erwünscht³⁾.

Das Methylester-Dihydrochlorid des *d*-Lysins wurde an beiden Aminogruppen carbobenzoxyliert und der Dicarbobenzoxy-ester I in das Dicarbobenzoxy-lysin-hydrazid II übergeführt. Das Hydrazid ergab mit salpetriger Säure das Azid III, das wir, ohne es in Substanz zu isolieren, mit *d*-Glutaminsäure-diäthylester zum Carbobenzoxy-dipeptidester IV kuppelten. Nach der Verseifung zur freien Säure V ergab die katalytische Abhydrierung der Carbobenzoxygruppen⁴⁾ die freie *d*-Lysyl-*d*-glutaminsäure VI.

Über analoge Zwischenstufen wurde aus dem Azid III mit freiem *l*-Histidin-methylester das *d*-Lysyl-*l*-histidin VII bereitet und als Sulfat isoliert.

d-Lysyl-*d*-glutaminsäure reagiert gegen Lackmus nahezu neutral. In alkohol. Lösung verhält sie sich gegen Thymol-phthalein als Dicarbonsäure. Bei der Untersuchung des fermentativen Verhaltens, die Hr. Dr. Hans Schleich ausgeführt hat, konnte vorläufig mit keinem der bekannten tierischen proteolytischen Fermente eine deutliche Spaltung wahrgenommen werden. Dieses eigentümliche Verhalten, das zu eiweiß- und ferment-chemi-

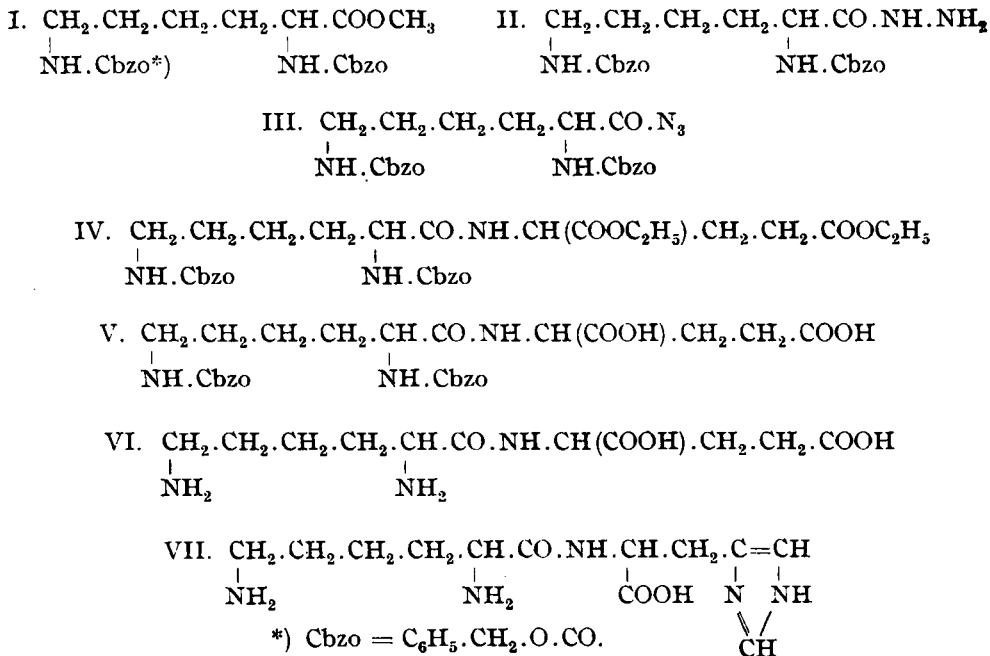
¹⁾ Fellow of the National Research Council in Biochemistry.

²⁾ M. Bergmann u. L. Zervas, B. **65**, 1092 [1932].

³⁾ Versuche in physiko-chemischer Hinsicht beabsichtigt der eine von uns (Greenstein) demnächst auszuführen.

⁴⁾ vergl. M. Bergmann u. L. Zervas, a. a. O.

schen Rückschlüssen Anlaß geben muß, wird uns noch eingehender beschäftigen.

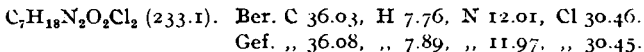


Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sprechen wir für die Gewährung von Mitteln unseren ergebensten Dank aus.

Beschreibung der Versuche.

d-Lysyl-*d*-glutaminsäure (VI).

d-Lysin-methylester-Dichlorhydrat: Der bisher nicht beschriebene Ester des optisch-aktiven Lysins wurde in der üblichen Weise mit Methylalkohol und Chlorwasserstoff bereitet. Ausbeute 90% d. Th. Schmp. 212° (korr.).



Das inaktive Lysin-methylester-Dichlorhydrat von Fischer und Suzuki⁵⁾ hat den Schmp. 218°.

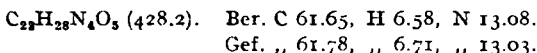
Dicarbobenzoxy-*d*-lysin-hydrazid (II): 7 g *d*-Lysin-methylester-Dichlorhydrat wurden in 30 ccm Wasser gelöst, mit 60 ccm Chloroform versetzt und stark gekühlt. Dann wurden je 1.2 g MgO und 5.1 g Carbobenzoxychlorid zugefügt und stark geschüttelt bis zum Verschwinden des Säurechlorid-Geruchs. Dann wurde nochmals dasselbe Verhältnis von Base und Säurechlorid zugegeben, wieder bis zum Verschwinden des Säurechlorid-Geruchs geschüttelt und dasselbe Verfahren zum drittenmal wiederholt. Die

⁵⁾ B. 38, 4173 [1905].

ganze Operation beanspruchte ungefähr 35 Min. Zum Schluß wurde, um den Überschuß von Säurechlorid schnell zu zersetzen, mit 3 ccm Pyridin kurze Zeit geschüttelt. Dann wurde mit 5-n. HCl schwach kongosauer gemacht, die Chloroform-Schicht 2-mal mit Wasser, mit Natriumbicarbonat und wieder mit verd. Salzsäure gewaschen, getrocknet und unter vermindertem Druck völlig verdampft.

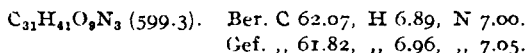
Da der resultierende Sirup schwer krystallisierte, haben wir auf die Isolierung des Dicarbobenzoxy-lysin-methylesters verzichtet und ihn sogleich in das krystallisierende Hydrazid übergeführt. Zu diesem Zweck wurde der Sirup in 30 ccm absol. Alkohol aufgenommen, mit 6.0 ccm Hydrazin-Hydrat versetzt und 1 Stde. gekocht. Beim Abkühlen krystallisierte das Hydrazid in Form langer Nadeln aus. Ausbeute 10 g, entspr. 80% d. Th., auf das Ester-Hydrochlorid berechnet.

Zur Analyse wurde nochmals aus heißem absol. Alkohol umkrystallisiert und bei 0.2 mm und 78° getrocknet. Schmp. 159°.



Dicarbobenzoxy-*d*-lysyl-*d*-glutaminsäure-diäthylester (IV): 12.9 g Hydrazid wurden mit 50 ccm Eisessig, 250 ccm Wasser und 30 ccm 5-n. HCl versetzt. Beim Schütteln ging fast alles in Lösung. Die stark gekühlte Lösung wurde dann mit einer wäßrigen Lösung von 3 g Natriumnitrit in Portionen versetzt, wobei sich das Azid als eine dicke, fadenziehende Masse abschied. Sie wurde schnell in Äther aufgenommen, mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der kongosauen Reaktion gewaschen. Dabei schieden sich in geringer Menge farblose Krystalle vom Schmp. 115–130° ab, die abfiltriert und nicht weiter untersucht wurden. Die ätherische Azid-Lösung wurde flüchtig mit Natriumsulfat getrocknet und alsbald mit einer trocknen ätherischen Lösung von Glutaminsäure-diäthylester (10 g) versetzt. Nach vielstündigem Stehen, erst bei Zimmer-Temperatur und dann in Eis, krystallisierte der Hauptteil des Kupplungsproduktes in langen Nadeln aus. Es wurde dann abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und die Mutterlauge bei vermindertem Druck abgedampft, wobei eine zweite Krystallisation eintrat. Ausbeute 8.0 g, entspr. 45% d. Th.

Zur Analyse wurde zweimal aus absol. Alkohol umkrystallisiert und bei 0.2 mm und 20° getrocknet. Schmelzpunkt ziemlich unscharf; das Produkt fängt bei 95° an zu sintern und schmilzt bei ungefähr 105°.



Dicarbobenzoxy-*d*-lysyl-*d*-glutaminsäure (V): 7.3 g Diäthylester wurden in 120 ccm Aceton gelöst und mit 34 ccm Natronlauge 2 Stdn. auf der Maschine geschüttelt, filtriert, mit 5-n. Salzsäure schwach kongosauer gemacht und unter vermindertem Druck abgedampft, wobei ein gelbliches Öl ausfiel. Der gesamte Rückstand wurde mit Chloroform aufgenommen, mit Natriumbicarbonat-Lösung geschüttelt und die Bicarbonat-Lösung angesäuert. Es fiel ein weißes Öl aus, welches bei vielstündigem Stehen in Eis krystallinisch wurde. Ausbeute 6.0 g, entspr. 90% d. Th.

Zur Analyse wurde aus Essigester umkrystallisiert und bei 0.2 mm und 20° getrocknet. Schöne, lange Nadeln. Die Substanz sinterte von 96° an und schmolz ungefähr

bei 130°. Vielleicht ist der unscharfe Schmelzpunkt auf eine Wasser-Abspaltung zwischen den beiden Carboxylen zurückzuführen.

$C_{27}H_{33}O_9N_3$ (543.2). Ber. C 59.64, H 6.11, N 7.73.
Gef. „ 59.74, „ 6.24, „ 7.54.

d-Lysyl-*d*-glutaminsäure: 3.0 g des oben besprochenen Präparates wurden in einem Methylalkohol-Wasser-Gemisch gelöst, mit 1 ccm Eisessig versetzt und dann im offenen Gefäß mit Palladiummohr als Katalysator hydriert. Nach 40 Min. war die Kohlensäure-Bildung beendet. Beim Verdampfen unter geringem Druck verblieb ein Sirup, der mehrmals mit Wasser aufgenommen und wieder verdampft wurde. Schließlich wurde mit sehr wenig Wasser aufgenommen und mit absol. Alkohol bis zur Trübung versetzt. Nach kurzem Stehen in Eis erfolgte Krystallisation schöner, farbloser Nadeln. Ausbeute fast quantitativ.

Zur Analyse wurde nochmals umkrystallisiert.

0.5034 g luft-trockne Substanz verloren bei 0.2 mm und 78° 0.0600 g an Gewicht.

$C_{11}H_{21}O_6N_3 + 2H_2O$. Ber. H_2O 11.6. Gef. H_2O 11.9.

Die getrocknete Substanz nahm an der Luft sehr schnell wieder Wasser auf.

0.1121 g Sbst.: 0.1977 g CO_2 , 0.0785 g H_2O . — 4.561 mg Sbst.: 0.599 ccm N (19°, 753 mm).

$C_{11}H_{21}O_6N_3$ (275.2). Ber. C 47.98, H 7.67, N 15.27.
Gef. „ 48.10, „ 7.83, „ 15.21.

$[\alpha]_D^{19} = +0.73^\circ \times 3.0336/1 \times 1.029 \times 0.0939 = +22.9^\circ$ (in Wasser). Schmp. 197° (korr.).

Die Substanz ist in Wasser sehr leicht löslich, in organischen Flüssigkeiten fast gar nicht. Ihre wäßrige Lösung reagiert neutral gegen Lackmus. In verd. Schwefelsäure gibt sie eine Fällung mit Phosphorwolframsäure.

d-Lysyl-*l*-histidin (VII).

Dicarbobenzoxy-*d*-lysyl-*l*-histidin-methylester: 17.1 g Carbobenzoxy-lysin-hydrazid wurden, wie zuvor beschrieben, in das Azid umgewandelt und das Azid mit Chloroform extrahiert. Der Chloroform-Auszug wurde 2-mal mit Wasser gewaschen, filtriert und kurz mit Natriumsulfat getrocknet. Dann wurden 10.2 g Histidin-methylester in Chloroform-Lösung zugegeben. Über Nacht schied sich eine gelatinöse Masse ab, die abfiltriert, mit Chloroform gewaschen und aus viel Essigester umkrystallisiert wurde. Ausbeute gegen 6 g vom Schmp. 138–140°. Das Präparat zeigte keine ausgeprägte Krystallform. Es war auch noch nicht ganz rein, genügte aber für die Weiterarbeit.

$C_{29}H_{36}O_7N_6$ (565.2). Ber. N 12.38. Gef. N 12.68.

Dicarbobenzoxy-*d*-lysyl-*l*-histidin: 9.5 g des eben beschriebenen Präparates wurden mit einer Mischung von 20 ccm *n*-Natronlauge und 50 ccm Methylalkohol 2 Stdn. auf der Maschine geschüttelt. Am Ende war alles gelöst. Nun wurde mit 20 ccm *n*-Salzsäure zur Trockne verdampft, der feste Rückstand mit Wasser gewaschen, in gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung gelöst, filtriert und mit Eisessig bis zur sauren Reaktion versetzt. Das verseifte Produkt schied sich als Öl ab, das sofort erstarrte. Es wurde mit der Mutterlauge auf dem Wasserbade erhitzt, bis fast alles gelöst war; von kleinen

Mengen Öl wurde dekantiert. Aus der gekühlten Lösung krystallisierten hübsche, weiße Nadeln. Ausbeute 2.5 g. Schmp. 157—162°.

Zur Analyse wurde bei 0.2 mm und 78° getrocknet.

$C_{28}H_{33}O_7N_5$ (551.2). Ber. C 60.95, H 6.02, N 12.69.
Gef. „ 61.00, „ 6.12, „ 12.55.

d - Lysyl - *l* - histidin - Sulfat: 2.5 g Dicarbobenzoxy - lysyl - histidin wurden in wenig heißem Alkohol gelöst, mit Wasser und 9.1 ccm *n*-Schwefelsäure versetzt und, wie bereits mehrfach beschrieben, katalytisch hydriert. Nach 1½ Stdn. bildete sich ein krystalliner Niederschlag, und nach 2 Stdn. war die Hydrierung zu Ende. Wir fügten mehr Wasser zu bis zur Lösung der organischen Stoffe, entfernten den Katalysator und verdampften. Der teilweise krystallinische Rückstand gab, in wenig heißem Wasser gelöst und mit absol. Alkohol versetzt, nach mehrstündigem Stehen bei 0° schöne Nadeln. Schmp. 205°. Ausbeute fast quantitativ.

Die luft-trockne Substanz verlor bei 78° und 0.2 mm in 15 Stdn. 16.3% an Gewicht, statt ber. 15.9% für 4H₂O.

0.1035 g getr. Sbst.: 0.1436 g CO₂, 0.0568 g H₂O. — 0.1040 g Sbst.: 0.1432 g CO₂, 0.0576 g H₂O. — 4.035 mg Sbst.: 0.644 ccm N (21°, 746 mm). — 0.1112 g Sbst.: 0.0693 g BaSO₄.

$C_{12}H_{21}O_3N_5, H_2SO_4$ (381.2). Ber. C 37.77, H 6.09, N 18.36, S 8.39.
Gef. „ 37.84, 37.55, „ 6.14, 6.19, „ 18.19, „ 8.55.

$[\alpha]_D^{20} = +0.48^0 \times 3.8096/1 \times 1.016 \times 0.051 = +35.3^0$ (in Wasser).

Das Peptid ist in Wasser sehr leicht löslich, dagegen in organischen Lösungsmitteln völlig unlöslich. Mit Phosphorwolframsäure in wäßriger Lösung bildet sich ein großer Niederschlag. Mit Diazobenzol-sulfonsäure entsteht in soda-alkalischer Lösung sofort eine blutrote Färbung.

336. Josef Lindner: Fehlerquellen in der organischen Elementaranalyse, IX. Mittel.: Metallisches Kupfer als Ersatz für Bleisuperoxyd in der Mikro-elementaranalyse.

[Aus d. Pharmazeut.-chem. Laborat. d. Universität Innsbruck.]
(Eingegangen am 12. Oktober 1932.)

A. Die Nachteile des Bleisuperoxyds.

Im Rahmen der vorangegangenen Untersuchungen wurde der schädliche Einfluß des Bleisuperoxyds auf die Kohlenstoff-Bestimmung in Mittel. I¹⁾, jener auf die Wasserstoff-Bestimmung in Mittel. VI²⁾ über Fehlerquellen behandelt. Unter den Erscheinungen, die zu berücksichtigen waren, steht die hygroskopische Wirkung des Superoxyds obenan und stellt sich nach den quantitativ durchgeführten Messungen als eine der bedenklichsten Fehlerquellen in der Elementaranalyse dar. Ein erfolgreicher Ausweg, um zu einer einwandfreieren Verbrennungs-Vorrichtung zu gelangen, schien in der Beschränkung der Superoxyd-Fällung zu liegen, weil eine nach Fr. Pregl³⁾ gefüllte Röhre, die 2 bis höchstens 3 g Superoxyd-Körner enthält, nach den

¹⁾ B. 59, 2561 [1926].

²⁾ B. 63, 1396 [1930].

³⁾ Die quantitative organische Mikro-analyse, 3. Aufl., Berlin 1930, S. 34.