

konstanten sind im Gang; sie sind apparativ schwierig, da aus äußeren Gründen von den meisten reinen Säuren nur wenige Milligramme hergestellt werden konnten.

Während die Schmelzpunkte aller folgenden Säuren in der jeweils angegebenen Literatur beschrieben

sind, ist der Brechungsindex n_D^{70} bei den meisten Säuren, soweit möglich, neu bestimmt worden.

Herrn Prof. Dr. A. BUTENANDT danken wir herzlich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung der vorliegenden Arbeit.

Zur Synthese von Dipeptiden des Arginins*

Von H. ZAHN und J. F. DIEHL

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg
(Z. Naturforsch. **12 b**, 85—92 [1957]; eingegangen am 2. November 1956)

N-Carbobenzoxypeptidäthyl- und -benzylester des ω -Nitro-L-arginins mit Glycin, DL-Alanin und DL-Serin wurden nach der Azid- und der Carbodiimidmethode dargestellt. Bei der Carbodiimidmethode entstanden als Nebenprodukte *N*-(Carbobenzoxylglycyl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff, *N*-(Carbobenzoxyl-DL-alanyl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff und *N*-(Carbobenzoxyl-DL-seryl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff. Katalytische Hydrierung der Carbobenzoxyl-Peptide und Carbobenzoxypeptidbenzylester führte zu den freien Peptiden.

Im Zusammenhang mit Arbeiten über Aminosäuresequenzen in Faserproteinen¹ interessierte uns die Synthese von Peptiden des Arginins mit Serin.

Arginylpeptide, bei denen Arginin über seine Carboxygruppe mit der Aminogruppe einer anderen Aminosäure verknüpft ist, wurden erstmals 1953 dargestellt. Bisher kamen dabei die Säurechlorid-,² die Pyrophosphitmethode³ und die Methode der gemischten Anhydride^{4, 5, 6} zur Anwendung.

Argininpeptide, bei denen die α -Aminogruppe mit der Carboxygruppe einer anderen Aminosäure verknüpft ist, wurden mit der Azlacton-,⁷ der Säurechloridmethode⁸ und der Methode der gemischten Anhydride^{4, 5} gewonnen.

Peptide des Serins jedoch wurden bisher fast ausschließlich nach der Azidmethode dargestellt. Eine Ausnahme bilden die nicht allgemein anwendbaren Synthesen über α -Halogenacylhalogenide⁹ und Di-

ketopiperazine¹⁰. Neuerdings wurden die Methode der gemischten Anhydride^{11, 12, 13}, die Säurechloridmethode^{11, 13} und die Carbodiimidmethode¹⁴ verwendet. Die Phosphoazamethode von GOLDSCHMIDT und LAUTENSCHLAGER liefert bei Peptiden des Serins viel schlechtere Ausbeuten als die Azidmethode¹⁵.

Da nach der Säurechloridmethode bisher Serylpeptide gar nicht und Arginylpeptide nur bei Verzicht auf die Nitroschutzgruppe (s. u.) gewonnen werden konnten, blieb für die Synthese von Arginin und Serin enthaltenden Peptiden von den bisher angewandten Methoden nur die der gemischten Anhydride übrig. Diese hat jedoch den Nachteil, daß sie häufig Racemisierung zur Folge hat¹⁶, vor allem wenn man zur Synthese von Tri- und höheren Peptiden übergeht¹⁷. Ferner haben wir bei der Anwendung dieser Methode das Auftreten von Nebenprodukten beobachtet, was kürzlich auch von anderer

* 3. Mitt. über Peptide: 2. Mitt. vgl. H. ZAHN u. E. SCHNABEL¹.

¹ H. ZAHN u. E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

² D. T. GISH u. F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5872 [1953].

³ G. W. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **75**, 6081 [1953].

⁴ K. HOFMANN, A. RHEINER u. W. D. PECKHAM, J. Amer. chem. Soc. **75**, 6083 [1953]; **78**, 238 [1956].

⁵ H. O. VAN ORDEN u. E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **208**, 751 [1954].

⁶ C. BERSE u. L. PICHE, J. org. Chemistry **21**, 808 [1956].

⁷ M. BERGMANN u. H. KÖSTER, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **167**, 91 [1927]; M. BERGMANN, L. ZERVAS u. V. DU VIGNEAUD, Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 1905 [1929].

⁸ M. BERGMANN, L. ZERVAS u. H. RINKE, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 40 [1934].

⁹ E. FISCHER u. H. ROESNER, Liebigs Ann. Chem. **375**, 199 [1910].

¹⁰ E. ABDERHALDEN u. A. BAHN, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **234**, 181 [1935].

¹¹ F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS u. G. R. SMITH, J. chem. Soc. [London] **1954**, 1049.

¹² D. M. THEODOROPoulos u. L. C. CRAIG, J. org. Chemistry **20**, 1169 [1955].

¹³ R. F. FISCHER u. R. R. WHETSTONE, J. Amer. chem. Soc. **77**, 750 [1955].

¹⁴ J. C. SHEEHAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 [1955].

¹⁵ E. SCHNABEL, Diplomarbeit, Heidelberg 1955.

¹⁶ M. B. NORTH u. G. T. YOUNG, Chem. and Ind. **1955**, 1597.

¹⁷ J. R. VAUGHAN, J. Amer. chem. Soc. **74**, 6137 [1952].

Seite beschrieben wurde^{18, 19}. Wir möchten hier über die Brauchbarkeit der Azidmethode zur Synthese von Argininpeptiden und der Carbodiimidmethode zur Synthese von Arginin- und Arginylpeptiden berichten*. Beide Methoden haben den Vorteil, daß sie keine Racemisierung verursachen.

1. Arginin- und Serinderivate

Um den basischen Charakter der Guanidogruppe des Arginins, der sonst bei Peptidsynthesen erhebliche Schwierigkeiten bereitet, zu unterdrücken, wurde die stark elektronegative Nitrogruppe eingeführt. Nach Durchführung der Peptidsynthese kann die Nitrogruppe durch Hydrierung wieder entfernt werden. Dieses Verfahren wurde zuerst von BERGMANN, ZERVAS und RINKE⁸ beschrieben und kam in letzter Zeit mehrfach zur Anwendung^{4, 5, 6}.

Zur Synthese der Argininpeptide haben wir den Äthyl- und den Benzylester des ω -Nitroarginins dargestellt. Der Benzylester hat den Vorteil, daß sich der Benzylrest gleichzeitig mit dem zum Schutz der Aminogruppe verwendeten Carbobenzoxyrest und der zur Abdeckung der Guanidogruppe eingeführten Nitrogruppe abhydrieren läßt, während bei den Äthylestern vorherige Verseifung erforderlich ist, die zur Spaltung der Peptidbindung und zur Racemisierung führen kann. Auf die Vorzüge der Verwendung von Benzylestern in der Peptidsynthese haben vor allem BRAND und ERLANGER²⁰ hingewiesen.

Die Darstellung von Nitroargininäthylesterhydrochlorid wurde von HOFMANN, RHEINER und PECKHAM⁴ versucht. Sie erhielten jedoch nur ein „gummy material“. Wir haben die Verbindung als weiße kristalline Substanz erhalten und durch Fällung mit Methylorange nach GURIN und SEGAL²¹ als Helianthathat näher charakterisiert.

Nitroargininbenzylesterhydrochlorid wurde in Anlehnung an ein Verfahren von CIPERA und NICHOLLS²² als sirupöse Masse gewonnen und ebenfalls als kristallines Helianthathat charakterisiert.

Für die Synthese von Arginyl-serin wurde Serinbenzylesterhydrochlorid über das Benzolsulfonat²³ dargestellt. Die relativ niedrige Ausbeute (41%) wird vor allem durch die Bildung des Nebenproduktes α -Amino- β -benzyloxy-propionsäurebenzylesterhydrochlorid verursacht.

2. Argininpeptide nach der Azidmethode

Mit Hilfe der Azidmethode wurde aus *N*-Carbobenzoxycylinazid und Nitro-L-argininäthylester Carbobenzoxyglycyl-nitro-L-arginin-äthylester gewonnen (Ia)*. Alkalische Verseifung lieferte die entsprechende Säure, die mit der nach BERGMANN⁸ dargestellten identisch ist. Die Hydrierung der Säure zu Glycyl-L-arginin-sulfat oder -acetat wurde schon von BERGMANN⁸ bzw. HOFMANN⁴ beschrieben. Analog wurde Carbobenzoxy-DL-alanyl-nitro-L-arginin-äthylester (II a) dargestellt, der durch alkalische Verseifung in die Säure, Carbobenzoxy-DL-alanyl-nitro-L-arginin (III)**, übergeführt wurde. Katalytische Hydrierung in Methanol/Eisessig lieferte DL-Alanyl-L-arginin-acetat (X) als amorphes Pulver, von dem ein kristallisiertes Diäcyanat erhalten werden konnte. Da bei der alkalischen Verseifung von Carbobenzoxy-DL-seryl-nitro-L-arginin-äthylester (IV a) weitgehende Spaltung der Peptidbindung eintrat – aus der Reaktionslösung wurde nach dem Ansäuern Carbobenzoxyserin isoliert – stellten wir den Carbobenzoxy-DL-seryl-nitro-L-argininbenzylester (Va) dar, der durch katalytische Hydrierung in kristallines DL-Seryl-L-argininacetat (XI) übergeführt wurde.

Entgegen dem bisher bei der Azidmethode üblichen Verfahren wurden Nitroargininäthyl- bzw. -benzylester, da sie in Äther und Essigester schwerlöslich sind, in äthanolischer Lösung eingesetzt. Ersatz des Äthanol durch Chloroform ist möglich, führt jedoch nicht zu höheren Ausbeuten. Die vier Z-Peptidester (Z = Carbobenzoxyrest $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO}-$) wanderten bei der Papierchromatographie in SBA (Sekundärbutanol-Ameisensäure-Wasser 75:15:10),

¹⁸ I. v. BRUNN-LOEBE u. G. SCHRAMM, Chem. Ber. **89**, 2045 [1956].

¹⁹ K. C. HOOPER, H. N. RYDON, J. A. SCHOFIELD u. G. S. HEATON, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3148.

* A n n. b. d. K o r r.: Im Novemberheft von Experientia (**12**, 446 [1956]) berichten R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, J.-P. WALLER u. P.-A. JAQUENOUD ebenfalls über die Synthese von Peptiden des Arginins nach der Carbodiimidmethode.

²⁰ E. BRAND u. B. F. ERLANGER, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3508 [1951].

²¹ S. GURIN u. C. F. SEGAL, J. Amer. chem. Soc. **58**, 2107 [1936].

²² J. D. CIPERA u. R. V. V. NICHOLLS, Chem. and Ind. **1955**, 16.

²³ H. K. MILLER u. H. WAELSCH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1092 [1952].

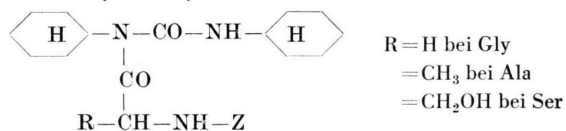
* Die römischen Ziffern sollen das Auffinden der Verbindungen in den Tab. 1 u. 2 erleichtern.

** Bei diesem und allen weiteren in kristallisierter Form erhaltenen Diastereomeren-Gemischen wurde beim Umkristallisieren keine Trennung in die Komponenten beobachtet oder versucht.

SBN (Sekundärbutanol-10-proz. Ammoniak 85 : 15) und Phenol-Wasser (8 : 2) mit der Lösungsmittelfront. Die Flecken wurden nach der Chlormethode²⁴ sichtbar gemacht. Es gelang nicht, aus den Estern die Hydrazide darzustellen. Das ist nicht überraschend, da es bisher auch nicht gelungen ist, aus Z-Nitroargininestern ein Hydrazid darzustellen²⁵. Die Ursache für dieses Verhalten ist in der Reaktionsfähigkeit der Nitroguanidogruppe mit Hydrazin²⁶ zu suchen.

3. Argininpeptide nach der Carbo-diimidmethode

Beim Versuch, Argininpeptide nach der Carbo-diimidmethode von SHEEHAN¹⁴ darzustellen, wurden beträchtliche Mengen der entsprechenden *N*-Acyl-*N,N'*-dicyclohexylharnstoffe



erhalten. Analoge Phthalyl- und Tosylverbindungen wurden von KHORANA²⁷ und SHEEHAN²⁸ als unerwünschte Nebenprodukte der Carbo-diimidmethode beschrieben.

Die Reaktion von Z-Glycin mit Nitroargininäthylester und DCC (Dicyclohexylcarbo-diimid) nach dem ursprünglichen Verfahren von SHEEHAN¹⁴ — im folgenden DCC-Methode A genannt — lieferte *N*-(Carbobenzoxycglycyl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff neben dem gewünschten, mit dem nach der Azidmethode dargestellten identischen Peptid (Ib). Die Trennung der beiden Produkte wurde durch fraktionierte Kristallisation erreicht. Mit Z-Alanin wurde *N*-(Carbobenzoxy-DL-alanyl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff erhalten, und mit Z-Serin *N*-(Carbobenzoxy-DL-seryl)-*N,N'*-dicyclohexylharnstoff. In beiden Fällen wurden die entsprechenden Z-Peptidester (IIb und IVb) nur als Sirupe erhalten, die noch mit dem Acyl-dicyclohexylharnstoff verunreinigt waren.

Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 5 Tage und portionsweise Zugabe eines 1,5-fachen Überschusses der Esterkomponente — DCC-Methode B — konnte die Ausbeute an Z-Glycyl-nitroargininäthylester (Ic) erheblich gesteigert werden. In diesem Fall wurde nur sehr wenig Z-Glycyl-dicyclohexyl-

harnstoff isoliert. Bei einer Reaktionszeit von 5 Tagen und Verwendung eines 1,5-fachen Überschusses an Nitroarginin-*benzyl*-ester — DCC-Methode C — wurde bei der Darstellung von Z-Seryl-nitroargininbenzylester (Vb) wieder eine größere Menge Z-Seryl-dicyclohexylharnstoff isoliert.

Nach den neueren Angaben von SHEEHAN²⁸ wird beim Arbeiten mit Acetonitril oder Methylenchlorid als Lösungsmittel die Bildung der Acylharnstoffe vermieden. Wegen der relativ geringen Löslichkeit mancher Z-Aminosäuren in reinem Methylenchlorid, vor allem des Z-Serins (und des Z-Nitroarginins im Falle der Synthese von Arginylpeptiden), haben wir die Reaktion in Methylenchlorid-Tetrahydrofuran-Mischung (etwa 1 : 1) ausgeführt. Bei einem unter Verwendung von Acetonitril durchgeführten Ansatz — DCC-Methode D — entsprachen die Ausbeuten an Z-Peptidester und Acylharnstoff etwa den nach der Methode B erhaltenen Ausbeuten.

Hydrierung des nach den Methoden A, B und D erhaltenen und dann verseiften Z-Glycyl-nitro-L-argininäthylesters und des nach Methode C erhaltenen Z-DL-Seryl-nitro-L-argininbenzylesters führte zu den gleichen Produkten wie die Hydrierung der entsprechenden, nach der Azidmethode dargestellten Verbindungen — vgl. 2.

Die drei Acyl-dicyclohexylharnstoffe wandern bei der Papierchromatographie in SBA, SBN und Phenol-Wasser mit der Lösungsmittelfront und können mit Hilfe der Chlormethode sichtbar gemacht werden. Da sie sich im *R_f*-Wert nicht von den entsprechenden Z-Peptidestern unterscheiden, wurde zur Identifizierung totalhydrolysiert (6-n. HCl, 105°, 24 Std.). Das Papierchromatogramm des Hydrolysats zeigt im Falle der Peptide die Flecken der beiden im Peptid enthaltenen Aminosäuren, im Falle des Acyl-dicyclohexylharnstoffs dagegen den Flecken von nur einer Aminosäure neben einem charakteristischen Flecken bei *R_f* = 0,7 (SBA), der nicht mit Ninhydrin, wohl aber nach der Chlormethode sichtbar gemacht werden kann.

4. Arginylpeptide nach der Carbo-diimidmethode

Zur Synthese von Arginylpeptiden kommt die Azidmethode nicht in Frage, da es, wie erwähnt, nicht gelungen ist, das Hydrazid von Z-Nitroarginin

²⁴ H. ZAHN u. H. WOLF, *Melliand Textilber.* **32**, 317 [1951].

²⁵ J. S. FRUTON, *Advances Protein Chem.* **V**, 64 [1949].

²⁶ A. F. MCKAY, *Chem. Reviews* **51**, 301 [1952].

²⁷ H. G. KHORANA, *Chem. and Ind.* **1955**, 1087.

²⁸ J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN u. G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1367 [1956].

herzustellen²⁵. Hier erwies sich dagegen die DCC-Methode als sehr brauchbar. Es wurden dargestellt: Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-glycinbenzylester (VI) – die Verbindung ist identisch mit der nach SMITH⁵ dargestellten – ferner Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-DL-alaninbenzylester (VII), Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-DL-serinäthylester (VIII) und -benzylester (IX). Die 4 Z-Peptidester wandern bei der Papierchromatographie in SBA und SBN an der Lösungsmittelfront (Chlormethode). Bildung des Acyl-dicyclohexylharnstoffs bei der Synthese der Z-Nitroargininpeptidester ist, wie die Papierchromatographie der Totalhydrolysate zeigt, wahrscheinlich, jedoch wurde kein kristallisiertes Nebenprodukt erhalten.

Durch katalytische Hydrierung wurden aus den entsprechenden Z-Peptidbenzylestern L-Arginyl-DL-alanin-acetat (XII) und L-Arginyl-DL-serin-acetat (XIII) erhalten. Die Hydrierung von Z-Nitroarginyl-glycinbenzylester (VI) wurde schon von SMITH⁵ beschrieben.

Experimenteller Teil

1. Arginin- und Serinderivate

a) Nitro-L-argininäthylester-hydrochlorid

In die Suspension von 20 g Nitroarginin⁸ (0,09 Mol) in 800 cm³ Äthanol wurde trockener Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Nach Eindampfen i. V. wurde der zurückbleibende Sirup in 400 cm³ Äthanol gelöst und erneut HCl bis zur Sättigung eingeleitet. Nach erneutem Eindampfen i. V. wurde noch zweimal in je 150 cm³ Äthanol gelöst und i. V. eingedampft. Der Sirup wurde in 150 cm³ Äthanol gelöst und abs. Äther bis zur Trübung zugegeben. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank und einigen Tagen bei Zimmertemperatur war der zunächst ölig ausgefallene Niederschlag kristallin. Durch Zugabe von mehr Äther wurde das Produkt vollständig ausgefällt. Ausb. nach dem Trocknen i. V. über P₂O₅: 24,8 g (96% d. Th.). Die zunächst sehr hygroskopische Substanz war nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol-Äther ziemlich luftbeständig, Schmp. 92–94°.

C₈H₁₇O₄N₅ · HCl (283,7)

Ber. C 33,85 H 6,35 N 24,69.

Gef. C 33,58 H 5,95 N 24,57.

R_f = 0,45 in SBN, 0,28 in SBA. [α]_D²⁵ = +12,2° (c 1,57 in Methanol). Fällung mit Methylorange aus wäßriger Lösung nach GURIN und SEGAL²¹ lieferte ein kristallines Helianth, Schmp. 175° nach Umkristallisieren aus Methanol.

C₈H₁₇O₄N₅ · C₁₄H₁₅O₃N₃S (552,6)

Ber. C 47,82 H 5,84 N 20,28.

Gef. C 47,42 H 5,85 N 20,47.

b) Nitro-L-argininbenzylester-hydrochlorid

15 g (0,07 Mol) feinpulverisiertes Nitroarginin wurden mit 13 g (0,08 Mol) Benzolsulfonsäure und 30 cm³ Benzylalkohol auf dem Wasserbad erhitzt, 40 cm³ heißer Tetrachlorkohlenstoff zugegeben und bei 90–100° Badtemperatur abdestilliert. Im Laufe von 6 Stdn. wurden noch 400 cm³ Tetrachlorkohlenstoff in 10 Portionen zugegeben und abdestilliert. Nach Zugabe von Triäthylamin bis zur alkalischen Reaktion zu dem in 200 cm³ Chloroform aufgenommenen Rückstand fiel etwas Nitroarginin aus. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurde in die Chloroformlösung bis zur sauren Reaktion Chlorwasserstoffgas eingeleitet, i. V. zum Sirup eingedampft und noch zweimal mit je 50 cm³ Äthanol i. V. eingedampft (Badtemperatur nicht über 100°). Aus dem in etwas Äthanol gelösten und mit gleichem Volumen Äther versetzten Sirup kristallisierte im Eisschrank Triäthylammoniumsalz aus. Das gleichzeitig in ölicher Form ausfallende Produkt wurde vom Salzniederschlag abgesaugt, die Ätherschicht abdekantiert, noch einmal mit Äther ausgeschüttelt und i. V. von Ätherresten befreit. Das sirupöse Produkt kristallisierte nicht und wurde, da im Papierchromatogramm Nitroarginin nur sehr schwach auftrat, direkt in die Reaktion mit Z-Serinazid eingesetzt. R_f = 0,62 in SBN, 0,54 in SBA. Mit Methylorange fiel aus wäßriger Lösung ein kristallines Helianth aus. Das aus Methanol umkristallisierte Helianth sinterte bei etwa 212°.

C₁₃H₁₉O₄N₅ · C₁₄H₁₅O₃N₃S (614,7)

Ber. C 52,75 H 5,57 N 18,23.

Gef. C 52,23 H 5,30 N 18,02.

c) DL-Serinbenzylester-hydrochlorid²⁹

Aus der Lösung von 26,2 g DL-Serin (0,25 Mol) und 43,5 g Benzolsulfonsäure (0,275 Mol) in 125 cm³ Benzylalkohol wurde der Benzylalkohol i. V. bei einer Badtemperatur von nicht über 130° möglichst weitgehend abdestilliert. Der zurückbleibende Sirup wurde nach dem Erkalten mit 125 cm³ abs. Äther verrührt. Der zunächst gebildete ölige Niederschlag war nach etwa 2 Stdn. kristallin. Er wurde mit je 125 cm³ Benzylalkohol und 2 g Benzolsulfonsäure noch zweimal wie beschrieben behandelt. Das so erhaltene Serinbenzylesterbenzolsulfonat wog 67 g. Es enthielt nach dem Papierchromatogramm noch Serin und Nebenprodukte, vor allem eine Substanz mit R_f = 0,90 in SBA, und wurde zur Reinigung in das Hydrochlorid verwandelt.

Die Suspension des Rohproduktes in 300 cm³ Chloroform wurde unter Eiskühlung mit einer etwa äquivalenten Menge Triäthylamin und dann mit 1 l Äther versetzt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages und gründlichem Nachwaschen mit Äther wurde in das Filtrat unter Eiskühlung Chlorwasserstoffgas eingeleitet, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Das zunächst sirupös ausfallende Serinbenzylester-hydrochlorid kri-

²⁹ DL-Serinbenzylester-hydrochlorid wurde von H. J. KESSLER (Diplomarbeit, Heidelberg 1955) aus Serin mit Benzylalkohol/HCl in 21,3% Ausbeute erhalten.

stallisierte im Eisschrank und wurde aus Äthanol-Äther umkristallisiert. Ausb. 23,4 g (41% d. Th. bez. auf Serin). $R_f=0,68$ in SBA. Schmp. 159–160°.

$C_{10}H_{14}O_3NCl$ (231,7) Ber. C 51,84 H 6,09 N 6,05.
Gef. C 52,09 H 6,12 N 5,98.

Aus den Mutterlaugen wurde ein kristallines, ninhydrinpositives Nebenprodukt erhalten, das als DL- α -Amino- β -benzyloxypropionsäurebenzylester-hydrochlorid identifiziert wurde. $R_f=0,90$ in SBA. Schmp. 140 bis 142°.

$C_{17}H_{19}O_3N \cdot HCl$ (321,8)
Ber. C 63,45 H 6,26 N 4,35.
Gef. C 63,69 H 6,14 N 4,15.

2. Argininpeptide nach der Azidmethode

a) Darstellung der Z-Peptidester

Z-Glycinazid und Z-Alaninazid wurden nach BRAND und ERLANGER²⁰, Z-Serinazid nach FRUTON³⁰ dargestellt.

Zur Synthese der Z-Peptidester wurde die Lösung von 0,01 Mol des Z-Aminosäureazids in Äther oder (bei Z-Serinazid) in Essigester mit einer Mischung aus äquimolekularen Mengen Nitroargininäthyl- bzw. -benzylester-hydrochlorid und Triäthylamin in Äthanol versetzt. Nach 24 Stdn. (im Eisschrank) und weiteren 2 bis 5 Tagen (bei etwa 15°) wurden Äther und Äthanol i. V. abgezogen; der Sirup wurde in Essigester aufgenommen, mit n -HCl, 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Der Äthylester des Z-Glycyl-(Ia) und der Benzylester des Z-Serylpeptids (Va) kristallisierten aus der Essigesterlösung aus und wurden aus Äthanol-Petroläther umkristallisiert. Die Äthylester des Z-Alanyl-(IIa) und des Z-Serylpeptids (IVa) kristallisierten nicht und wurden durch mehrfaches Umfällen aus Äthanol/Petroläther gereinigt.

Die Z-Peptidderivate sind in Tab. 1 aufgeführt.

b) Darstellung der Z-Peptide

Die Verseifung der Z-Peptidäthylester erfolgte in methanolischer Lösung mit n -NaOH bei Zimmertemperatur. Der Verlauf der Reaktion läßt sich im Papierchromatogramm mit SBN als Lösungsmittelgemisch leicht verfolgen, da sich bei Verwendung dieses Gemisches die R_f -Werte der Ester und der freien Säuren sehr stark unterscheiden. Nach 30 Min. wurde die Reaktionslösung mit n -HCl auf pH 4 angesäuert. Dabei fiel Carbobenzoxy-alanyl-nitroarginin (III) in ölgiger Form aus. Nach leichtem Einengen i. V. kristallisierte der Niederschlag im Eisschrank im Verlauf einiger Tage. Er wurde aus Äthanol-Petroläther umkristallisiert. Dagegen ergab die Papierchromatographie, daß die Behandlung von Z-Seryl-nitroargininäthylester (IVa) mit Natronlauge statt zur Esterhydrolyse vor allem zur Peptidspaltung führte. Aus der angesäuerten Reaktionslösung kristallisierte Z-Serin aus.

Z-Alanyl-nitroarginin (III) ist in Tab. 1 aufgeführt.

c) Darstellung der Peptide

Die Hydrierung der Z-Peptidbenzylester und Z-Peptide zu den Acetaten der Peptide erfolgte in 10% Essig enthaltendem Methanol am Palladiumkatalysator³¹ unter Verwendung eines Vibromischers im Verlauf von 8–10 Stunden. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen i. V. wurde der Rückstand mit etwas Äthanol versetzt und erneut eingedampft. Das Eindampfen wurde mehrfach wiederholt. Der in etwas Methanol gelöste Rückstand konnte im Falle des Serylarginin-acetats (XI) durch Zugabe von Äthanol und etwas Äther zur Kristallisation gebracht werden. Dagegen wurde Alanyl-arginin-acetat (X) nur amorph erhalten und durch Zugabe eines Überschusses Flaviansäure aus wäßriger Lösung als kristallisiertes Diflavinat gefällt.

Die Peptide sind in Tab. 2 aufgeführt.

3. Argininpeptide nach der Carbodiimidmethode

DCC-Methode A: Zur Lösung von 0,01 Mol Z-Aminosäure in Tetrahydrofuran wurde eine Methylenchloridlösung (beide Lösungsmittel gereinigt und getrocknet) von 0,012 Mol Nitroargininäthylester-hydrochlorid und 0,012 Mol Triäthylamin zugefügt. Nach Zugabe von 0,012 Mol DCC und 5-stdg. Stehen bei Zimmertemperatur wurde zur Zerstörung von überschüssigem DCC mit Essigsäure geschüttelt, filtriert, nach Abtrennung der wäßrigen Phase i. V. eingedampft und in Essigester aufgenommen. Die filtrierte Essigesterlösung wurde mit n -HCl, Bicarbonat und Wasser ausgeschüttelt. Im Eisschrank oder bei leichtem Einengen i. V. kristallisierten die Acyldicyclohexylharnstoffe und im Falle von Z-Glycyl-nitro-argininäthylester und Z-Seryl-nitroargininbenzylester auch die Z-Peptidester aus. Die Acyldicyclohexylharnstoffe sind so beständig, daß sie nicht etwa beim Ausschütteln mit Bicarbonat- oder Sodalösung hydrolysiert und so abgetrennt werden können.

DCC-Methode B: Zur Lösung von 0,01 Mol der Z-Aminosäure in Tetrahydrofuran wurde eine Lösung von 0,01 Mol Nitroargininäthylester-hydrochlorid und 0,01 Mol Triäthylamin in Methylenchlorid sowie 0,012 Mol DCC zugefügt. Im Verlauf von 5 Tagen wurde täglich eine frisch angesetzte Methylenchloridlösung von 0,001 Mol Esterhydrochlorid und 0,001 Mol Triäthylamin zugegeben. Am 6. Tag wurde mit Essigsäure geschüttelt und wie bei Methode A aufgearbeitet.

DCC-Methode C: Zur Lösung von 0,01 Mol der Z-Aminosäure in Tetrahydrofuran wurde eine Lösung von 0,015 Mol Nitroargininbenzylester-hydrochlorid und 0,015 Mol Triäthylamin in Methylenchlorid sowie 0,012 Mol DCC zugefügt. Nach 5-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde wie bei Methode A aufgearbeitet.

DCC-Methode D: Wie Methode A, jedoch unter Verwendung von dest. Acetonitril als Lösungsmittel für

³⁰ J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **146**, 465 [1942].

³¹ H. WIELAND, Ber. dtsch. chem. Ges. **45**, 489 [1912].

| | Verbindung ^a | Methode | Ausb. ^b [%] | Schmp. ^c | [α] _D ²⁵ | Formel | Elementaranalyse ^d | | | | Acyl-dicyclohexylharnstoff | |
|------|------------------------------------|------------------------|--|---------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|----------------|--------------|--------------------------|----------------------------|--------------|
| | | | | | | | | C | H | N | Ausb. [%] | Schmp. |
| I a | Z-Gly-L-nitroargOÄt | Azid | 54 | 112—114° | —6,9° c 1,68 Methanol | C ₁₈ H ₂₆ O ₇ N ₆ | ber. gef. | 49,31 49,46 | 5,98 5,76 | 19,17 19,19 | — | — |
| b | Z-Gly-L-nitroargOÄt | DCC—A | 58,6 | identisch mit I a | | | | | | | 16,2 | 143,5—145,5 |
| c | Z-Gly-L-nitroargOÄt | DCC—B | 71 | identisch mit I a | | | | | | | 3,6 | 143,5—145,5° |
| d | Z-Gly-L-nitroargOÄt | DCC—D | 67,5 | identisch mit I a | | | | | | | 3,1 | 143,5—145,5° |
| II a | Z-DL-Ala-L-nitroargOÄt | Azid | sirupöses Produkt, durch Verseifung in III übergeführt | | | | | | | | — | — |
| b | Z-DL-Ala-L-nitroargOÄt | DCC—A | uneinheitliches, sirupöses Produkt | | | | | | | | 25 | 132—134° |
| III | Z-DL-Ala-L-nitroargOH ^e | Verseifung von II a | 59 ^f | 153—155° | +3,6° c 1,93 Äthanol | C ₁₇ H ₂₄ O ₇ N ₆ | ber. gef. | 48,11 48,07 | 5,70 5,69 | 19,80 19,70 | — | — |
| IV a | Z-DL-Ser-L-nitroargOÄt | Azid | 62 | amorph | —6,6° c 9,54 Äthanol | C ₁₉ H ₂₈ O ₈ N ₆ | ber. gef. | 48,71 49,03 | 6,03 6,20 | 17,94 17,86 | — | — |
| b | Z-DL-Ser-L-nitroargOÄt | DCC—A | uneinheitliches, sirupöses Produkt | | | | | | | | 23 | 166—167° |
| V a | Z-DL-Ser-L-nitroargOBz | Azid | 55 | 113—115° | —7,9° c 0,82 Äthanol | C ₂₄ H ₃₀ O ₈ N ₆ | ber. gef. | 54,33 54,41 | 5,70 5,65 | 15,85 16,07 | — | — |
| b | Z-DL-Ser-L-nitroargOBz | DCC—C | 61 | identisch mit V a | | | | | | | 17,3 | 166—167° |
| VI | Z-L-nitroarg-GlyOBz | DCC—A | 54,2 | 152—154° | —13,9° c 1,0 Methanol | identisch mit nach SMITH ⁵ dargestelltem | | | | kein krist. Nebenprodukt | | |
| VII | Z-L-nitroarg-DL-AlaOBz | DCC—A | 53,3 | 149—151° | —16,8° c 1,1 Äthanol | C ₂₄ H ₃₀ O ₇ N ₆ | ber. gef. | 56,02 56,04 | 5,88 6,03 | 16,33 16,43 | kein krist. Nebenprodukt | |
| VIII | Z-L-nitroarg-DL-SerOÄt | DCC—A | 35 | 175—177° | —5,2° c 1,0 90%ig- Äthanol | C ₁₉ H ₂₈ O ₈ N ₆ | ber. gef. | 48,71 48,54 | 6,03 6,02 | 17,94 18,01 | kein krist. Nebenprodukt | |
| IX | Z-L-nitroarg-DL-SerOBz | DCC—A | 58 | 176—178° | —4,9° c 1,0 90%ig- Äthanol | C ₂₄ H ₃₀ O ₈ N ₆ | ber. gef. | 54,33 54,78 | 5,70 5,64 | 15,85 16,04 | kein krist. Nebenprodukt | |

Tab. 1. Peptidderivate.

^a) Abkürzungen nach E. BRAND, Ann. Rev. Biochem. 1947, 224; b) Mittelwerte von 2—4 Ansätzen; bei I d nur 1 Ansatz; c) die Schmp. sind korrigiert; d) alle Verbindungen wurden vor der Analyse 18 Stdn. i. V. bei 80° über P₂O₅ getrocknet; e) von L-Ala ausgehend haben HOFMANN et al. ⁴ Z-L-Ala-L-Nitroarg und L-Ala-L-Arg-acetat dargestellt; f) bezogen auf Z-Ala-hydrazid.

| Verbindung ^a | Methode | Ausb. ^b [%] | Schmp. ^c | [α] _D ^d [°] | Formel | Elementaranalyse ^d | | | | R _f -Werte | |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|--------------|----------------|-------------------------|-----------------------|--|
| | | | | | | C | H | N | Phenol-H ₂ O | SBA | |
| X | DL-Ala-L-arg-acetat ^e | Hydrierg. von III | amorph | -2,8° c 0,95 H ₂ O | — | — | — | — | 0,78 | 0,20 | |
| — | DL-Ala-L-arg-diflavanat | — | 174–176° | — | C ₂₃ H ₃₃ O ₄ N ₃ · 2 H ₂ O | ber. 38,28 gef. 38,29 | 3,88 3,86 | 13,85 13,68 | — | — | |
| XI | DL-Ser-L-arg-acetat | Hydrierg. von V | 148–150° | -16,9° c 0,95 H ₂ O | C ₁₁ H ₂₃ O ₄ N ₃ · 1/2 H ₂ O | ber. 39,99 gef. 40,06 | 7,32 7,27 | 21,20 21,39 | 0,75 | 0,13 | |
| XII | L-Arg-DL-ala-acetat | Hydrierg. von VII | 147–148° | +12,7° c 1,14 H ₂ O | C ₁₁ H ₂₃ O ₄ N ₃ | ber. 43,27 gef. 42,63 | 7,59 7,26 | 22,94 22,85 | 0,83 | 0,22 | |
| XIII | L-Arg-DL-ser-acetat | Hydrierg. von IX | amorph | +27,3° c 3,33 H ₂ O | — | — | — | — | 0,56 | 0,06 | |
| — | L-Arg-DL-ser-diflavanat | — | 164° | — | C ₂₃ H ₃₃ O ₄ N ₃ · H ₂ O | ber. 38,42 gef. 38,27 | 3,77 3,81 | 13,90 13,97 | — | — | |

Tab. 2. Peptide.

a, b, c, e, vgl. entsprechende Anmerkungen zu Tab. 1. d) Die Diflavanate wurden 18 Std. i. V. bei Zimmertemperatur über P₂O₅ getrocknet. Die anderen Verbindungen wurden 18 Std. i. V. bei 80° über P₂O₅ getrocknet.

die Z-Aminosäure und den Nitroargininester. Wegen der Mischbarkeit des Acetonitrils mit Wasser wurde nach dem Schütteln der Reaktionslösung mit Essigsäure und dem Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs das Filtrat mit dem doppelten Volumen Essigester ausgeschüttelt, die wäßrige Phase verworfen und die Essigesterphase wie bei Methode A weiterbehandelt.

N-(Carbobenzoxycyl)-N,N'-dicyclohexylharnstoff kristallisierte bei der Darstellung von Z-Gly-nitroargOÄt nach DCC-Methode A, B und D neben dem gewünschten Produkt aus der Essigesterlösung aus und wurde von diesem durch frakt. Krist. getrennt. Methode A lieferte 16,2% Z-Gly-dicyclohexylharnstoff neben 58,6% Z-Peptidester. Methode B nur 3,6% neben 71% Z-Peptidester, Methode D 3,1% neben 67,5% Z-Peptidester. Schmp. 143,5–145,5° nach Umkristallisation aus Essigester.

C₂₃H₃₃O₄N₃ (415,5) Ber. C 66,48 H 8,01 N 10,12.
Gef. C 66,97 H 8,20 N 10,48.

N-(Carbobenzoxy-DL-alanyl)-N,N'-dicyclohexylharnstoff kristallisierte beim Versuch der Darstellung von Z-Ala-nitroargOÄt nach Methode A als einziges Produkt aus der Essigesterlösung aus. Ausb. 25% d. Th. Schmp. 132–134° nach Umkristallisation aus Äthanol-Äther.

C₂₄H₃₅O₄N₃ (429,5) Ber. C 67,11 H 8,21 N 9,78.
Gef. C 67,36 H 7,99 N 9,94.

N-(Carbobenzoxy-DL-seryl)-N,N'-dicyclohexylharnstoff kristallisierte beim Versuch der Darstellung von Z-Ser-nitroargOÄt nach Methode A als einziges Produkt aus der Essigesterlösung aus. Ausb. 23% d. Theorie. Dieselbe Verbindung kristallisierte bei der Darstellung von Z-Ser-NitroargOBz nach Methode C neben dem gewünschten Z-Peptidester aus der Essigesterlösung aus und wurde von diesem durch frakt. Kristallisation getrennt. In diesem Fall wurden 17,3% Z-Ser-dicyclohexylharnstoff neben 61% Z-Peptidester erhalten. Schmp. 166–167° nach Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser.

C₂₄H₃₅O₅N₃ (445,5) Ber. C 64,70 H 7,92 N 9,43.
Gef. C 64,75 H 7,68 N 9,71.

4. Arginylpeptide nach der Carbodiimidmethode

Die Synthese der Arginylpeptide erfolgte analog der der Argininpeptide nach Methode A. Eine Lösung von 0,01 Mol Carbobenzoxynitro-L-arginin⁸ in Tetrahydrofuran wurde mit einer Lösung von 0,012 Mol Aminosäureester-benzolsulfonat oder -hydrochlorid und 0,012 Mol Triäthylamin in Methylenchlorid und mit 0,012 Mol DCC versetzt. Nach 5-stdg. Stehen bei Zimmertemperatur wurde aufgearbeitet wie bei der Synthese der Argininpeptide unter 3. beschrieben. Die Z-Peptidester begannen meist schon beim Ausschütteln der Essigesterlösung auszukristallisieren. Z-Nitroarg-

GlyOBz (VI) und -AlaOBz (VII) wurden aus Äthanol, Z-Nitroarg-serOÄt (VIII) und -SerOBz (IX) aus wasserhaltigem Aceton (Aceton : H₂O = 9 : 1) umkristallisiert.

Die Z-Peptidester sind in Tab. 1 aufgeführt.

Die Darstellung der Aminosäurebenzylester erfolgte nach MILLER und WAELSCH²³. Glycin- und Alaninbenzylester wurden als Benzolsulfonate (unter Zugabe einer äquivalenten Menge Triäthylamin) in die Peptidsynthese eingesetzt. Das Serinbenzylester-benzolsulfonat wurde wie unter 1c beschrieben in das Hydrochlorid verwandelt.

Zur Hydrierung der Z-Peptidbenzylester wurde verfahren wie unter 2c beschrieben. L-Arginyl-DL-alaninacetat (XII) wurde aus Methanol-Äthanol-Äther umkristallisiert. L-Arginyl-DL-seryl-acetat (XIII) wurde in amorpher Form erhalten und mit überschüssiger Flaviansäure aus wäßriger Lösung als kristallines Di-flavianat gefällt.

Die Peptide sind in Tab. 2 aufgeführt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Chemiefonds für die Unterstützung der Arbeit.

Konstitution und Wirkung biologisch aktiver Verbindungen

IV. Mitt.: Weitere halogenhaltige, phosphorfreie organische Insektizide

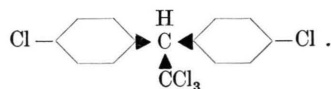
Von WERNER PERKOW

Aus dem Forschungslaboratorium der Norddeutschen Affinerie, Hamburg

(Z. Naturforsch. **12 b**, 92—95 [1957]; eingegangen am 21. August 1956)

Als „biologisch aktive Zentren“ werden bei weiteren chlorierten Kohlenwasserstoffen und anderen phosphorfreien Insektiziden wiederum Kohlenstoffatome mit charakteristisch verminderter Elektronendichte für die Wechselwirkung mit Fermenten verantwortlich gemacht. Das gleiche Wirkungsprinzip tritt auch in anderen Verbindungsklassen auf.

In vorangegangenen Mitteilungen versuchten wir, bei der Betrachtung der insektizid wirkenden Verbindungen Dichlordiphenyltrichloräthan (DDT)¹, Diäthyl-*p*-nitrophenyl-thiophosphat (E 605)² und weiterer phosphorhaltiger Insektengifte³ zu zeigen, daß jeweils eine charakteristische Ladungsverteilung in den Molekülen mit der biologischen Wirksamkeit in Zusammenhang steht. Wir sind der Ansicht, daß stets nur ein begrenzter Molekülteil oder oft auch nur ein einziges, besonders beschaffenes Atom als Wirkungsträger anzusehen ist. Die an einem solchen „biologisch aktiven Zentrum“ vorhandene Elektronenanzordnung tritt bei allen Gliedern einer biologisch wirksamen Gruppe mit gleichem Grundgerüst auf. Beispielsweise bewirken bei den der DDT-Familie zugehörigen Verbindungen die Substituenten des mittelständigen, tertiären Kohlenstoffatoms an diesem stets eine stark verringerte Elektronendichte:



Eine Stärkung oder Schwächung dieses charakteristischen Zustandes hat bei der DDT-Gruppe ebenso

wie bei anderen Substanzgruppen stets auch eine entsprechende Änderung der insektiziden Wirkungs-Intensität zur Folge. Man darf daraus den Schluß ziehen, daß bei Abwandlungen eines als biologisch wirksam erkannten Moleküls die typischen Eigenarten seines „biologisch aktiven Zentrums“ erhalten bleiben müssen oder innerhalb gewisser Grenzen möglichst noch intensiviert werden sollen.

Der Wirkungs-Mechanismus aller Insektizide dürfte auf einer Wechselwirkung mit Fermenten beruhen und kann als energetisches Wechselspiel zwischen komplementär beschaffenen Molekülgefügen aufgefaßt werden. Das „aktive Zentrum“ bildet die Grundlage dieser Wechselwirkung. Die Beschaffenheit der übrigen Molekülteile liefert gewissermaßen die Feinstruktur des Schlüssels in dem bekannten, bildhaften Vergleich des Wirkungsprinzips der Fermentreaktionen mit dem Formverhältnis von Schlüssel zu Schloß. Das Gefüge der Reaktionspartner muß sich sowohl in räumlicher wie auch energetischer Form an den Wirkungspunkten entsprechen. Eine Änderung der Feinstruktur durch geringfügige Variation einzelner Molekülteile bei erhaltener typischer Ladungsverteilung kann z. B. eine Verschie-

¹ W. PERKOW, Z. Naturforsch. **11 b**, 389 [1956].

² W. PERKOW, Z. Naturforsch. **11 b**, 460 [1956].

³ W. PERKOW, Z. Naturforsch. **12 b**, 33 [1957].